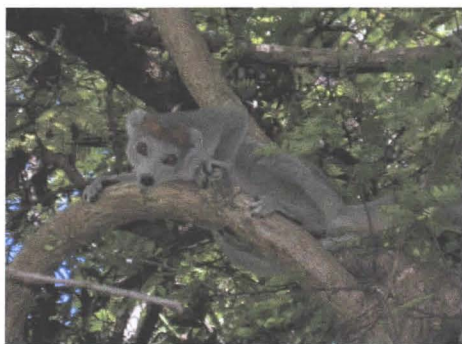


Ecole nationale vétérinaire de Toulouse  
23 chemin des Capelles  
31076 Toulouse cedex 03

CIRAD-EMVT  
Campus international de Baillarguet  
BP 5035 34032 Montpellier cedex 01

Mémoire de CEAV pathologie animale en régions chaudes  
Promotion 2002-2003

« ETUDE DES MEGACHIROPTERES EN TANT QUE RESERVOIR DE  
PARAMYXOVIRUS MADAGASCAR »



Etude réalisée au sein de l'unité de virologie de



INSTITUT PASTEUR  
DE MADAGASCAR

Julie ATTALI

Maître de stage: Dominique ROUSSET, Chef de l'unité de virologie de l'institut Pasteur de Madagascar, BP 1274 Antananarivo 101 Madagascar

Enseignant responsable : Jean CHANTAL, ENVT 23 chemin des capelles 31076 Toulouse

## SOMMAIRE

Remerciements	5
Introduction	6
Première partie : Présentation du lieu de stage	7
1. Généralités sur Madagascar	7
1.1 Situation Géographique	7
1.2 Climat	8
1.3 Population	9
1.4 Aspect culturel	9
1.5 Situation politico-économique	10
1.6 Situation sanitaire	10
1.6.1 Maladies endémiques	10
1.6.2 Epidémies	11
1.6.3 Structures sanitaires	11
2. L'institut Pasteur de Madagascar	11
2.1 Activités de recherche et de santé publique	11
2.2 Activités de service	12
2.3 Activités de formation	12
2.4 Présentation de l'unité de virologie	12
Deuxième Partie : Les Paramyxovirus émergents	13
1. Historique	13
1.1 Emergence Hendra	13
1.2 Emergence Ménangle	13
1.3 Emergence Nipah	13
1.4 Emergence Tioman	14
2. Clinique	14
2.1 Symptômes	14
2.1.1 Hendra	14
2.1.1.1 Chez l'homme	14
2.1.1.2 Chez l'animal	14
2.1.2 Nipah	15
2.1.2.1 Chez l'homme	15
2.1.2.2 Chez l'animal	15
2.1.3 Ménangle	16
2.1.3.1 Chez l'homme	16
2.1.3.2 Chez l'animal	16
3. Lésions	16
4. Etiologie	16
4.1 Morphologie Composition	17
4.2 Propriétés physico-chimiques	17
4.3 Propriétés antigéniques	18
4.4 Propriétés enzymatiques : activité neuraminidasique	18
4.5 Effet cytopathique	18
5. Taxonomie	18
6. Pathogénie	18
7. Diagnostic	19
7.1 Clinique et lésionnel	19

7.2 Epidémiologique	19
7.3 De laboratoire	19
7.3.1 Diagnostic virologique	19
7.3.1.1 Précautions	19
7.3.1.2 Isolement viral	19
7.3.1.3 Immuno-histochimie	20
7.3.1.4 Microscopie électronique	20
7.3.1.5 Biologie moléculaire : PCR et séquençage	20
7.3.2 Sérologie	20
7.3.2.1 Elisa	20
7.3.2.2 Séroneutralisation	20
7.4 Différentiel	21
8. Traitement	21
9. Pronostic, séquelles, complications	21
10. Epidémiologie	21
10.1 Espèces concernées	22
10.2 Réservoir	22
10.2.1 Hendra	22
10.2.2 Nipah	22
10.2.3 Menangle	22
10.2.4 Tioman	23
10.3 Mode de transmission	23
10.3.1 Matières virulentes	23
10.3.2 Transmission	23
10.3.2.1 Circulation du virus au sein du réservoir	23
10.3.2.2 Transmission du réservoir aux hôtes sensibles	23
10.3.2.3 Transmission intraspécifique chez les hôtes sensibles	23
10.3.2.3.1 Hendra	24
10.3.2.3.2 Nipah	24
10.3.2.3.3 Menangle	24
10.3.2.4 Mère/foetus	24
11. Prophylaxie	24
11.1 Médicale	24
11.2 Sanitaire	24
11.2.1 Offensive	24
11.2.2 Défensive	25
11.2.2.1 Protection des personnes à risque	25
11.2.2.2 Prévention de l'infection	25
11.2.2.3 Détection précoce	25
11.2.2.4 Contrôle de la circulation virale	26
12. Répartition	26
Troisième Partie : Etude des virus transmis par les Mégachiroptères à Madagascar	27
1. Problématique à l'échelle internationale	27
2. Objectifs	28
2.1 Principal	29
2.2 Secondaires	29
3. Cas particulier de Madagascar	29
3.1 Généralités sur les Mégachiroptères de Madagascar	29
3.1.1 Classification	29



3.1.2 Généralités sur les chauves- souris à Madagascar	30
3.1.2.1 Habitat	30
3.1.2.2 Rôle des chiroptères frugivores dans l'écosystème	30
3.1.3 Description des différentes espèces de Megachiroptères	30
3.1.3.1 Pteropus rufus	31
3.1.3.1.1 Morphologie	31
3.1.3.1.2 Reproduction	31
3.1.3.1.3 Habitat	31
3.1.3.2 Eidolon dupreanum	32
3.1.3.2.1 Morphologie	32
3.1.3.2.2 Habitat	32
3.1.3.2.3 Reproduction	32
3.1.3.3 Roussettus madagascariensis	32
3.1.3.3.1 Morphologie	32
3.1.3.3.2 Habitat	32
3.1.3.3.3 Reproduction	33
3.2 Matériel et méthodes	33
3.2.1 Capture des chauves –souris	33
3.2.1.1 Objectifs de la mission	33
3.2.1.1.1 Etude morphométrique	33
3.2.1.1.2 Etude d'impact environnemental	33
3.2.1.1.3 Etude virologique	33
3.2.1.2 Préparation de la mission	33
3.2.1.2.1 Logistique	33
3.2.1.2.2 Capture d'entraînement dans le parc de l'IPM	33
3.2.1.2.3 Autorisation de capture et formalités	34
3.2.1.3 Lieu de capture	34
3.2.1.4 Méthodes de capture	34
3.2.2 Prélèvements	36
3.2.2.1 Prélèvements des animaux qui seront relâchés	36
3.2.2.2 Dissection et réalisation des prélèvements pour animaux sacrifiés	36
3.2.2.3 Traitement des prélèvements	37
3.2.2.4 Devenir des prélèvements	37
3.2.3 Analyses des prélèvements	37
3.2.3.1 Méthode : protocole Elisa	37
3.2.3.1.1 Principe général	37
3.2.3.1.2 Les différentes étapes de la réaction	39
3.2.3.1.2.1 Sensibilisation des plaques par l'AG à J1	39
3.2.3.1.2.2 Fixation de l'anticorps	39
3.2.3.1.2.3 Dépôt du conjugué	39
3.2.3.1.2.4 Révélation de la réaction	39
3.2.3.1.2.5 Lecture et interprétation des DO	39
3.3 Résultats	40
3.3.1 Réalisation d'une collection de sérums	40
3.3.2 Mise au point du test	41
3.4 Discussion	41
3.4.1 Difficultés techniques et logistiques	41
3.4.1.1 Pour la préparation de la mission	41
3.4.1.2 Pendant la mission	41
3.4.2 Difficultés d'obtention de prélèvements	42



3.4.2.1 Pendant la mission en particulier	42
3.4.2.2 A Madagascar en général	42
3.4.3 Etat d'avancement du projet du RIPIA et réponses aux objectifs	42
Conclusion	43
Annexes	44
Bibliographie	58

## Remerciements

### **A Dominique Rousset**

chef de l'unité de virologie de l'IPM  
pour m'avoir permis d'organiser rapidement un projet alors que le SRAS  
m'empêchait de partir en Thaïlande. Sa gentillesse, sa disponibilité, et sa pédagogie  
m'ont permis d'apprendre énormément.

### **A Mr Maucière**

directeur de l'IPM  
pour m'avoir accueillie dans ce lieu de stage hors du commun.

### **A Steve Goodman et Scott Cardiff**

pour m'avoir fait partager leur passion pour la biologie et la conservation.

### **A l'équipe d'Entomo de l'IPM**

pour m'avoir initiée aux joies de l'entomologie lors de la mission à Mahajanga.

### **A Mr Gouffé et au laboratoire MERIAL**

pour m'avoir encouragée et m'avoir apporté leur soutien financier  
sans lequel je n'aurais pu réaliser cette merveilleuse expérience.

### **A toutes les personnes et lieux féériques que j'ai croisés**

## INTRODUCTION

Des virus de la sous-famille des Paramyxovirinae ont été associés au cours des dix dernières années à l'émergence de nouvelles maladies chez l'homme et chez l'animal.[1] Quatre de ces nouveaux virus ont été décrits dans la région pacifique ouest et ont pour particularité de partager un même réservoir, des chauves-souris frugivores du genre *Pteropus*. Tous ces nouveaux virus n'appartiennent pas à un même genre. Les virus Menangle et Tioman appartiennent au genre Rubulavirus, un genre classiquement décrit au sein de la sous-famille des Paramyxovirinae tandis que les virus Hendra et Nipah appartiennent à un nouveau genre Henipavirus accepté par le comité exécutif de l'ICTV.

Les virus Hendra et Nipah ont été responsables chez l'homme et chez l'animal de syndromes pulmonaires et de méningo-encéphalites mortels. Le virus Menangle a causé des troubles de la reproduction en élevage porcin. Ces épidémies ont eu de lourdes conséquences médicales et économiques.

La distribution géographique de ces virus se limite à leur pays de découverte. Il est vraisemblable que la distribution géographique des chauves-souris du genre *Pteropus* se superposera en partie ou totalement avec celles de ces Paramyxovirus. Le Réseau international des instituts Pasteurs et instituts associés (RIPIA) est bien placé pour répondre à cette question puisque plusieurs Instituts Pasteur se trouvent sur la zone de distribution de ces chauves-souris. L'étude des Paramyxovirus à Madagascar fait donc partie d'un projet plus large.

Alors que les instituts d'Asie ont de grandes chances d'isoler les Paramyxovirus, aucune prédiction ne peut être faite à Madagascar où ces virus et leurs réservoirs n'ont jamais été étudiés. Déterminer ou non la présence de Paramyxovirus chez les Megachiroptères sur la grande île sera donc l'objet de notre étude.



## **1. Généralités sur Madagascar [2]**

### **1.1. Situation Géographique [3]**

Il y a 165 millions d'années un ensemble issu de l'Afrique s'est détaché pour constituer Madagascar et la péninsule indienne.

Depuis, le canal du Mozambique sépare Madagascar de l'Afrique avec ses 400 Km de large. La partition entre l'Inde et Madagascar a été plus tardive (88 millions d'années).

Au carrefour de l'Afrique et de l'Asie, Madagascar puise ses origines dans ces deux continents. Cette île-continent, la quatrième du globe, a une superficie de 587 000 km<sup>2</sup>, une longueur de 1500 km et une largeur maximale de 480 km.

Située entre 12° et 25° de latitude sud, Madagascar est traversée par le tropique du Capricorne. Le point culminant de l'île est à 2876 m (Tsaratanana).

L'évolution de la faune et la flore de l'île, reflète l'histoire géologique et tectonique de l'île qui est singulière.

« La nature semble s'être isolée dans ce sanctuaire pour créer des modèles résolument différents de ceux qu'elle a développés ailleurs. Les formations les plus étranges et les plus merveilleuses se rencontrent à chaque nouveau pas. » (Joseph Commerson, naturaliste 1770).

Les phénomènes de spéciation se sont manifestés avec une très grande ampleur. Ainsi sur la grande île on distingue de nombreuses espèces endémiques dont beaucoup sont menacées de disparition à cause de la déforestation abusive.

## 1.2. Climat [4]

Madagascar connaît diverses conditions climatiques du fait des variations d'altitude et de l'orientation nord-sud de l'île. Les alizés régnant à l'Est et les moussons au Nord-ouest, la plupart des précipitations tombent sur la côte orientale, les versants est et l'extrémité nord.

Les régions situées au sud-ouest des hautes terres restent sèches en quasi permanence. Les gradients de variation écologique sont particulièrement brusques. La carte suivante montre la variété des bioclimats de l'île.

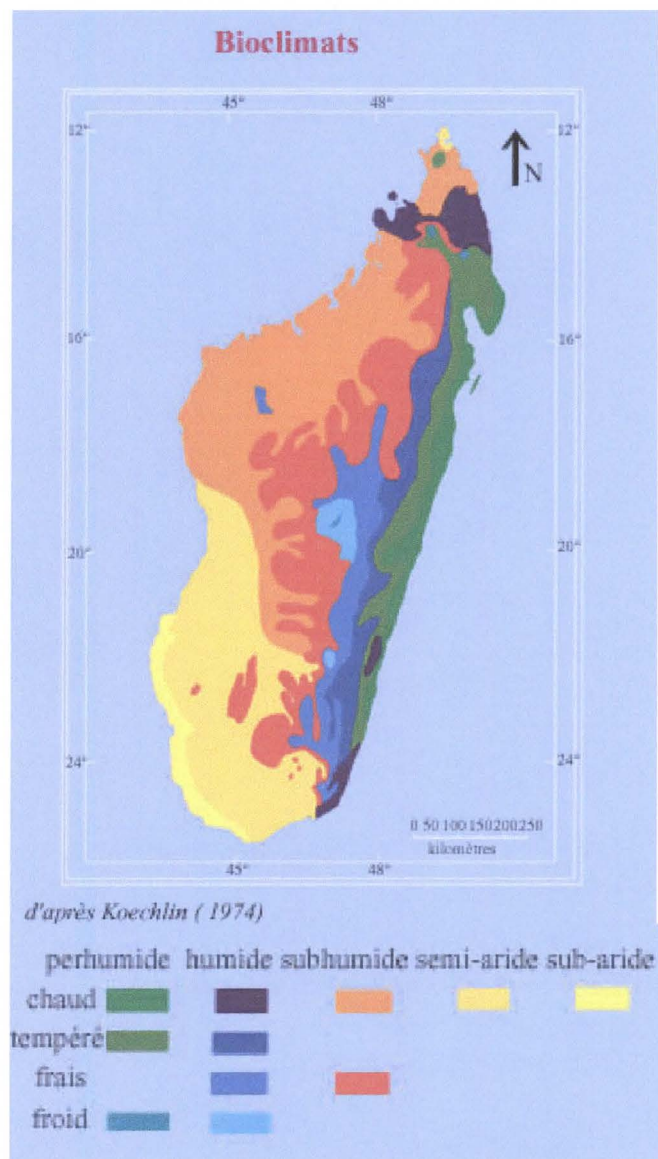
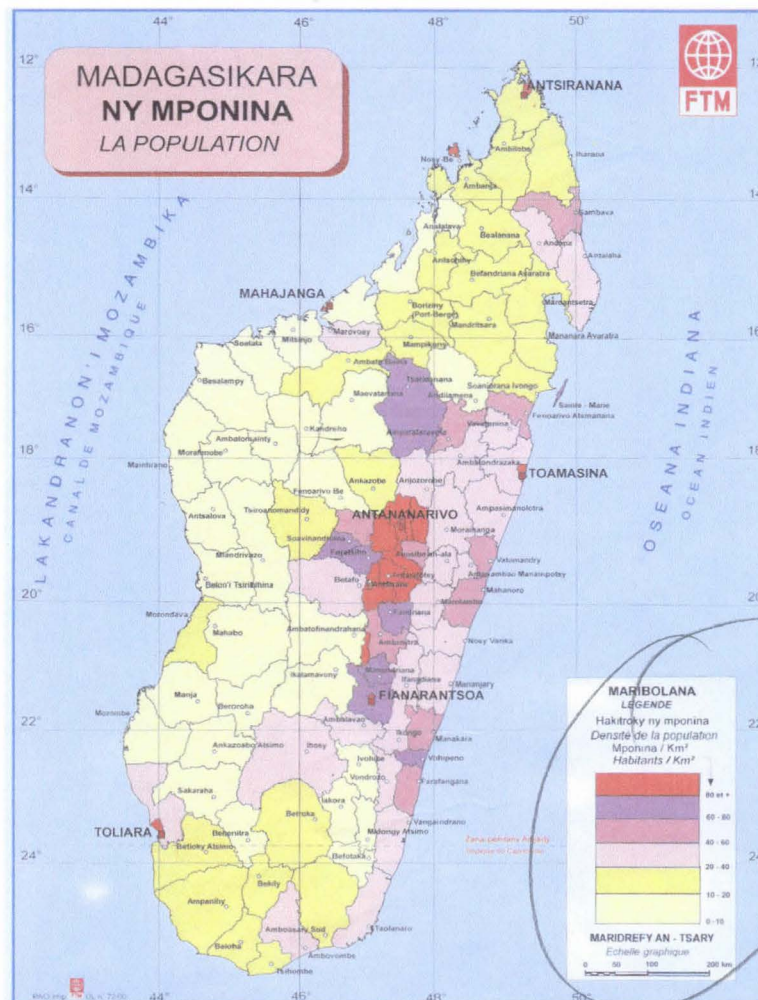


Figure 1 : Carte des bioclimats d'après Atlas du paludisme IPM

### 1.3. Population [5]

Madagascar compte plus de 15 millions d'habitants inégalement répartis sur l'ensemble du territoire. La carte ci-dessous montre bien cette disparité.

Carte de répartition de la population (source FTM)



Regarde  
illisible

Plus des deux tiers habitent la campagne. Il existe une grande disparité entre les villes et les campagnes notamment concernant la scolarisation, l'accès à l'électricité, à l'eau, aux soins...

La tranche d'âge 0-5 ans représente 18% de la population, les 5-14 ans représentent 26%, les 15-49 ans 44% et les plus de 50ans 12%.

### 1.4. Aspect culturel

Deux religions dominent à Madagascar : le christianisme et l'islam. Mais par-dessus tout, compte, le culte des Ancêtres ou « razana ». A la fois philosophie de la vie et de mort, système religieux, cadre social et mémoire collective, le culte des



ancêtres éclaire de nombreux aspects du système de pensée malgache. Les scientifiques lors de l'accomplissement de leur travail sont forcés d'en tenir compte. La culture malgache contemporaine traduit la double influence africaine et asiatique. Si les premiers Malgaches apportèrent avec eux les cultures vivrières de l'Asie de Sud-est, et notamment le riz, la contribution africaine se traduit par l'élevage du zébu ou encore le lamba, vêtement traditionnel.

La langue mêle des racines asiatiques et bantoues, voire arabes. Les groupes ethniques qui soudent Madagascar aujourd'hui, émergent de cette double influence au fil des années. Les traits asiatiques dominent chez les Mérimina des hautes terres centrales ainsi que chez les Betsileo voisins, tandis que les caractéristiques des Sakalava de l'Ouest et les Bara du Centre-Sud témoignent plutôt de leur origine africaine.

### **1.5. Situation politico-économique**

Ancienne colonie française, Madagascar a obtenu son indépendance en 1960. Depuis trois républiques se sont succédées. Après une grave crise politique survenue au moment des élections présidentielles de 2001-2002, Marc Ravalomanana dirige un pays affaibli.

Si Madagascar est connue comme un pays riche en faune et flore rares, en pierres précieuses, en main d'œuvre abondante, en sols et climats variés, il figure parmi les pays les plus pauvres du monde. [5]

Le PNB par habitant qui est de 260\$ US est l'un des plus bas du monde. L'économie repose sur l'agriculture et la pêche qui emploient 85% de la population. Le mauvais état des routes paralyse le commerce. Le secteur touristique mérite d'être développé. Madagascar bénéficie de l'aide financière internationale qui soutient son l'économie depuis de nombreuses années. [2]

### **1.6. Situation sanitaire [6]**

L'espérance de vie s'élève à 56 ans. La mortalité infantile est l'une des plus élevée au monde.

Ceci traduit une faille dans le système de santé et d'hygiène. Le manque d'eau courante, l'éloignement des structures sanitaires, l'inaccessibilité des structures de santé par manque de moyens financiers, les maladies endémiques et les épidémies sont autant de facteurs qui expliquent ce taux élevé de mortalité. [5]

#### **1.6.1. Maladies endémiques**

Parmi les nombreuses maladies qui existent sous forme endémique à Madagascar, le paludisme cause régulièrement la mort d'hommes et d'enfants par faute de traitement. Des programmes de luttas ont été mis en place mais ils sont confrontés au problème de financement.

Les maladies parasitaires comme la bilharziose, la cysticercose posent également un problème de santé publique majeur avec des zones où la prévalence atteint 40%.

La lèpre est toujours présente, la poliomyélite aussi. Madagascar est l'un des principaux foyers d'endémie pesteuse dans le monde. La rage persiste aussi sous forme endémique. [6]

### **1.6.2. Epidémies [6]**

Récemment une épidémie de cholera a eu lieu.

Les maladies sexuellement transmissibles ont une prévalence très élevée ce qui fait craindre une explosion de l'infection au VIH qui reste pour le moment modérée en comparaison avec les autres pays africains.

### **1.6.3. Structures sanitaires [5]**

Le système de santé est bâti à l'image du découpage administratif du pays. Six régions sanitaires ont été établies dans les six provinces autonomes.

Les établissements de soins peuvent être répartis en trois catégories :

- les centres de santé de base : CSB pour les premiers contacts. Les CSB 1 sont gérés par du personnel paramédical, les CSB 2 par du personnel médical. Ils sont au nombre de 2381 dont 2131 publics.

- les centres hospitaliers de district : CHD ou centres de référence pour les premiers recours.

- les centres hospitaliers régionaux et les centres hospitaliers universitaires CHR ou CHU pour les consultations externes de référence, les examens complémentaires ainsi que pour les actes médicaux et chirurgicaux spécialisés.

De nombreuses ONG sont également sur place pour développer le système de santé.

## **2. L'institut Pasteur de Madagascar [6]**

L'Institut Pasteur de Madagascar (IPM) crée en 1898, est un institut franco-malgache, appartenant au Réseau International des Instituts Pasteur et Instituts Associés (RIPIA), sous tutelle du Ministère de la Santé de Madagascar et reconnu d'utilité publique.

Il remplit traditionnellement des missions de recherche, de santé publique, de service et de formation.

### **2.1. Activités de recherche et de santé publique [6]**

Les activités de recherche sont orientées par les priorités de santé publique locales définies par le Ministère de la Santé. L'IPM peut être sollicité pour des missions d'expertise ou des interventions sur les épidémies, à Madagascar mais dans tout l'Océan Indien.

Six axes de recherche sont prioritaires : le paludisme, la peste, la tuberculose, les maladies virales et autres maladies émergentes ainsi que la bilharziose. L'IPM est en outre centre national de référence pour les arbovirus et fièvres hémorragiques, pour la grippe et la poliomyélite, pour la rage, pour le VIH, et pour les mycobactéries. L'IPM est centre collaborateur OMS pour la peste et laboratoire central pour les bilharzioses et la cysticercose.

Ainsi les activités de recherche et de santé publique se complètent et se renforcent mutuellement au bénéfice de la santé des populations.



## **2.2. Activités de service [6]**

L'IPM est aussi un important prestataire de service dans le domaine de la santé.

Il dispose d'un centre de biologie clinique effectuant des analyses médicales en hématologie, biochimie, immunologie, bactériologie et anatomo-pathologie.

L'IPM possède aussi un laboratoire d'hygiène des aliments et de l'environnement qui est le laboratoire national de référence d'analyse des eaux dans les industries agro-alimentaires et de contrôle des denrées d'origine animales, pour les paramètres microbiologiques. Ce centre a aussi une mission d'expertise dans le cadre de la démarche qualité en entreprises, d'audit de laboratoires.

L'IPM est aussi centre international de vaccination ainsi que centre de référence national pour la rage. Il assure le traitement antirabique, le diagnostic des animaux suspects et l'approvisionnement en vaccins.

## **2.3. Activités de formation [6]**

Ces activités sont menées en étroite collaboration avec le Ministère de la santé, les universités et d'autres institutions publiques ou privés.

L'IPM accueille des stagiaires, ainsi que des chercheurs (DEA, thésards, post-doctorant), forme des techniciens de laboratoire et organise des formations continues pour les médecins de l'Océan Indien. L'IPM dispense aussi des cours sur l'hygiène et la qualité.

L'IPM dispose d'un centre de documentation et d'une base de données Internet avec accès en ligne aux revues scientifiques.

## **2.4. Présentation de l'unité de virologie du Dr D. Rousset**

L'unité est composée par deux médecins, chercheurs, 7 techniciens et une stagiaire.

Les axes de recherches principaux sont les poliovirus et enterovirus et la surveillance des maladies émergentes ou réémergentes à caractère épidémique (west-nile, paramyxovirus, virus grippaux, VIH, Hépatites). Le programme de recherche Paramyxovirus et Mégachiroptères colle parfaitement à la thématique des maladies émergentes.



les grosses régions d'élevage porcin sont à leurs tours touchées en Février 1999. L'extension de l'épidémie est attribuée aux mouvements d'animaux en provenance de Kinta (1<sup>er</sup> foyer).

Un mois plus tard, onze cas humains d'encéphalites et de syndromes respiratoires sont recensés parmi le personnel des abattoirs de Singapour qui s'approvisionnaient dans les zones foyers de Malaisie. Un décès est enregistré. Fin mai 1999, l'épidémie s'étend à Sungai Buluh (centre-ouest de la péninsule Malaisienne) et fait un mort.

Début Mars 1999, un nouveau Paramyxovirus est isolé à partir du LCR d'un patient du village de Sungai Nipah par l'équipe du Pr Chua de l'université de médecine de Kuala Lumpur. Au total sur 265 cas humains recensés, 105 ont été fatals.

#### **1.4. Emergence Tioman, 1999 [17]**

La découverte de ce virus a été fortuite. Lors d'une enquête épidémiologique du virus Nipah menée dans les îles Tioman (Côte est de la péninsule Malaisienne), ce nouveau Paramyxovirus a été isolé à partir des prélèvement d'urine de Megachiroptères.

## **2. Clinique**

### **2.1. Symptômes**

#### **2.1.1. Hendra**

##### **2.1.1.1. Chez l'homme [18]**

Seul 2 cas ont été répertoriés. La durée de la période d'incubation n'a pu être déterminée.

Le premier patient a présenté un syndrome respiratoire aigu avec congestion, œdème et hémorragie pulmonaire. [15] L'autre a souffert d'un syndrome méningitique après contact étroit avec des chevaux malades, il semblait totalement guéri quand 13 mois après s'est développé un syndrome encéphalitique retard. Il présentait alors de brusques changements d'humeur, des convulsions tonico-cloniques, et un déficit moteur de la face qui s'est aggravé en hémiplegie droite. Après une phase de coma, le patient est décédé un mois après son admission à l'hôpital. [7],[15]

##### **2.1.1.2. Chez l'animal [15], [11], [19]**

La période d'incubation chez le cheval, varie de 8 à 15 jours avec une moyenne de 10 jours.

La maladie se manifeste sous forme suraiguë provoquant la mort de l'animal en 1 à 3 jours après l'apparition des premiers symptômes. [9] A l'examen clinique, on note de l'anorexie, une hyperthermie forte (41°C), un abattement important de l'animal, une ataxie, une congestion importante des muqueuses, un oedème sous cutané des parties déclives, un syndrome respiratoire. Ce syndrome respiratoire se manifeste par de la tachypnée avec une dilatation des naseaux, un tirage costal, un jetage nasal muco-purulent de couleur jaunâtre. A l'auscultation pulmonaire, on note une matité diffuse caractéristique d'un œdème pulmonaire et une forte congestion pulmonaire, ainsi que des épanchements pleuraux. A l'auscultation cardiaque, les bruits du coeur sont assourdis, signe d'un épanchement péricardique. [9]

## **1. Historique [1]**

### **1.1. Emergence Hendra, 1994 [7] [8], [9],[10],[11]**

En Septembre 1994, un syndrome respiratoire aigu affecte soudainement les chevaux de course pur sang du centre d'entraînement de Brisbane (banlieue de Hendra, état du Queensland, Australie) paralysant ainsi le secteur des courses équestres. Cet épisode fait suite au retour d'une femelle gestante d'un haras où a été recensée une mort subite. Treize des vingt chevaux atteints succombent. L'étiologie demeure inconnue, cependant les causes toxiques et les maladies exotiques comme la peste équine sont exclues. Des mesures de quarantaine sont immédiatement mises en place, les chevaux infectés guéris sont abattus et l'épidémie est maîtrisée. Quelques jours après la mort des premiers cas, le propriétaire du centre et un palefrenier sont atteints d'un syndrome respiratoire. Le propriétaire décède après trois semaines d'hospitalisation et de soins intensifs. En Octobre 1995, un éleveur de Makay (Queensland) qui avait réalisé les autopsies de deux chevaux morts treize mois auparavant décède. Les deux foyers semblent avoir la même étiologie. Un nouvel agent viral appartenant à la famille des Paramyxovirus est identifié et nommé Equine Morbillivirus avant d'être rebaptisé Hendra Virus. (HeV). En 1999, une jument pur sang meurt en 24H près de Cairns (nord de Queensland). Aucun autre animal n'est impliqué. Des mesures de quarantaine sont prises et le foyer est jugulé. [8, 9]

### **1.2. Emergence Menangle, 1997 [12],[13]**

D'avril à Septembre 1997, dans une porcherie industrielle du New South Wales (Australie), on constate la baisse des performances reproductrices, des troubles de la reproduction, des avortements, de la mortinatalité, des malformations congénitales. La maladie s'est déclarée séquentiellement dans les quatre bandes de la porcherie.

### **1.3. Emergence Nipah, 1999 [14],[15]**

Fin Septembre 1998, un groupe d'éleveurs de porcs de la périphérie de la ville d'Ipoh (district de Kinta, état de Pérag, Malaisie) déclarent un syndrome fébrile encéphalitique. Le taux de mortalité est très élevé avoisinant les 40%. Cet épisode a été précédé d'un syndrome respiratoire et encéphalitique chez les porcs dans ce même district. L'épizootie a été attribuée à la peste porcine classique.

L'encéphalite japonaise est incriminée pour expliquer les cas humains. En effet, en Malaisie l'Encéphalite Japonaise (EJ), arbovirose zoonotique, est alors la première cause d'encéphalite virale, la maladie est associée aux porcs et la forme clinique est encéphalitique. [16] De plus, certains sérums de patients présentent des anticorps et même pour certains des antigènes du virus de l'EJ (JEV). Des mesures de prophylaxie contre l'EJ qui consistent en la désinsectisation et la vaccination sont alors prises par le Ministère de la santé.

Ces mesures n'empêchent pas l'apparition d'un nouveau foyer à Sikimat (état de Negeri Sembilan, Malaisie) en décembre 1998. Puis Sungai Nipah et Bukit Pelandok,



pulmonaire, ainsi que des épanchements pleuraux. A l'auscultation cardiaque, les bruits du coeur sont assourdis, signe d'un épanchement péricardique. [9]

## 2.1.2. Nipah

### 2.1.2.1. Chez l'homme

La période d'incubation varie dans 90% des cas de 4 jours à 2 semaines[15] mais peut atteindre une durée de 4 mois. [20] L'infection est asymptomatique chez seulement 8 à 15% des personnes. Un large éventail de symptômes allant d'un état fébrile à une encéphalite mortelle en passant par des troubles neurologiques ont été observés. [14]

Le tableau suivant présente les symptômes les plus fréquemment rencontrés lors de l'épidémie en Malaisie pendant la phase aiguë de l'infection. [21],[22]

SYMPTOMES [21],[22]	FREQUENCE en %
hyperthermie	97
céphalées	65
vertiges	36
vomissement	27
réduction de la conscience	22
affection respiratoire	14
toux improductive	13
hypertension[22]	47
tachycardie{Goh, 2000 #95	32
signes neurologiques	
myosis ou mydriase	56
aréflexie avec hypotonie	56
coma nécessitant une ventilation artificielle	52
Myoclonies segmentaires (diaphragme)	32
tremblements	24
méningite	28
convulsions tonico-cloniques	23
nystagmus	17
ataxie cérébelleuse	9
ptose bilatérale	4
dysarthrie [22]	3
dysphagie [22]	2

Lors de l'épisode de NiV à Singapour, des symptômes respiratoires étaient associés aux signes neurologiques.

La phase aiguë conduit dans 45% des cas à un coma nécessitant une ventilation artificielle, une hypotension sévère, une bradycardie et enfin à la mort.

### 2.1.2.2. Chez l'animal [23],[15]

La durée de l'incubation est de 7 à 14 jours.

Le taux de mortalité chez les porcs varie de 5 à 15 % tandis que le taux de morbidité atteint les 100%.

Les manifestations cliniques chez le porc dépendent de l'âge :



-Les porcs de moins de 6 mois présentent un accès fébrile accompagné de signes respiratoires tels que la dyspnée, la tachypnée, une toux sèche provoquant parfois de l'hémoptysie. Des signes neurologiques comme les tremblements musculaires, les spasmes et les myoclonies, l'ataxie, la parésie allant jusqu'à la paralysie flasque ou spastique peuvent accompagner ces signes respiratoires.

-Chez les verrats et les truies, l'examen clinique révèle de l'hyperthermie, de la dyspnée, du jetage, accompagnés de signes neurologiques comme l'agitation, le pousser au mur, le nystagmus, les grincements de mâchoire, les spasmes tétaniques et l'apoplexie. Des avortements précoces ainsi que des morts subites ont aussi été observés.

### **2.1.3. Menangle**

#### **2.1.3.1. Chez l'homme [12]**

Un épisode de syndrome grippal a été décrit avec myalgies, céphalées, frissons, transpiration importante, malaise, douleur dorsale, courbatures, et photophobie. A ceci s'ajoutent des manifestations cutanées : un rash cutané qui disparaît au bout d'une semaine. Cet épisode fébrile s'est accompagné d'une importante perte de poids dans les deux cas humains décrits. Le danger en terme de mortalité pour l'homme n'est à ce jour pas déterminé. [12]

#### **2.1.3.2. Chez l'animal [15],[23]**

Chez les porcs ce virus est responsable de troubles de la reproduction. Les animaux, à part les truies en période de reproduction ne présentent pas de signes cliniques. Le virus est très contagieux : 90% des animaux ont effectué une séroconversion. Il induit une baisse des performances reproductrices avec une diminution de la taille des portées, une baisse de la fécondité, un retour en chaleurs précoce, [23] de la mortalité, des avortements, des momifications de fœtus, des malformations congénitales du système nerveux central et périphérique ainsi que des malformations des os longs : brachygnathie, arthrogrypose. Une hypoplasie pulmonaire et une myocardite sont parfois constatées chez les nouveaux nés ou chez les morts-nés. Les performances reproductrices reviennent à la normale 15 semaines après le passage du virus dans une porcherie. [13, 23, 24]

### **3. Lésions [22],[21],[21],[25],[26]**

Les lésions sont majoritairement des dégénérescences de l'endothélium des capillaires qui se situent soit au niveau des poumons entraînant œdème, hémorragie et fibrose pulmonaire soit au niveau du cerveau entraînant hémorragie et dégénérescence extensive de la matière grise et de la matière blanche.

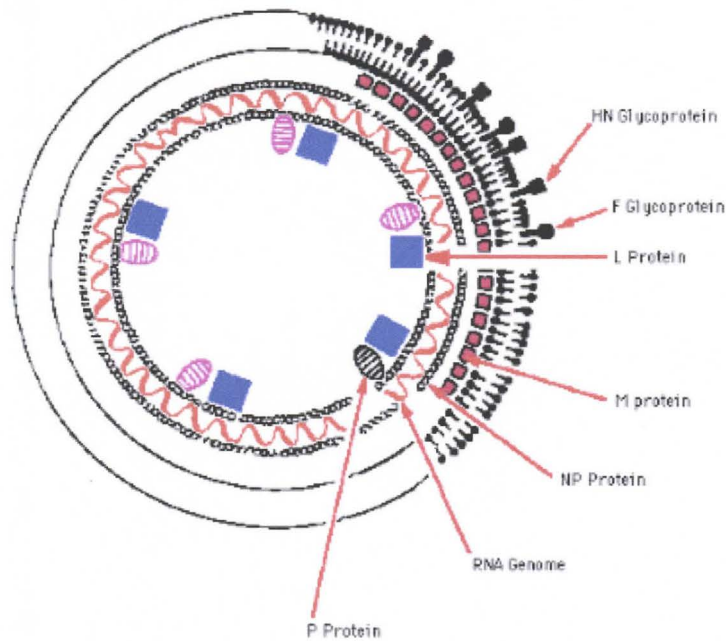
Ces lésions sont à mettre directement en rapport avec la clinique.

Une liste exhaustive des lésions est fournie en annexe 2.

### **4. Etiologie [27],[28]**

Ces quatre virus appartiennent à l'ordre des Mononegavirales à la famille des Paramyxoviridae et à la sous-famille des Paramyxovirinae.

#### 4.1. Morphologie, composition



La nucléocapside est formée de simples brins d'ARN viral associés à des protéines. Le virion est pleïomorphe avec un diamètre variable allant de 38 à 600 nm et une longueur de 1670 nm pour HeV et NiV et une longueur de 500 nm pour TiV et MenV. L'enveloppe, formée directement à partir de la cellule hôte par bourgeonnement, contient trois glycoprotéines transmembranaires. La capside, hélicoïdale, porte des spicules typiques des Paramyxovirus, d'une hauteur approximative de 17 nm et d'un diamètre de 5 nm. Elle apparaît chez HeV comme doublement réfringente car les spicules ont 2 hauteurs différentes (15 et 18nm) tandis qu'ils sont tous à la même hauteur (17nm) chez NiV, MenV et TiV ce qui donne l'impression d'une simple enveloppe réfringente. [27]

Les virions contiennent une molécule d'ARN de polarité négative, non segmentée d'une longueur d'environ 15kb et dont le poids moléculaire varie de  $5 \text{ à } 7 \cdot 10^6$  daltons.

Il existe trois groupes de protéines : [29]

- les protéines du complexe transcriptase : L, (lipoprotéine) NP, (nucléoprotéine) P, (polymérase) liées à l'ARN et formant la nucléocapside.
- les protéines d'enveloppe permettant la fusion et l'attachement à la cellule hôte : F (protéine de fusion) et G (protéine d'attachement)
- la protéine de matrice M ayant un rôle structural.

#### 4.2. Propriétés physico-chimiques

De par leur nature de virus enveloppés, les virions sont très sensibles à la chaleur, aux solvants lipidiques, aux détergents ioniques et non ioniques, au formaldéhyde et aux agents oxydants.



### 4.3. Propriétés antigéniques

Les protéines d'attachement et de fusion ont un rôle immunogène important. HeV et NiV ont une grande communauté antigénique et présentent donc des réactions croisées lors des tests si bien que les tests mis au point pour HeV ont été utilisés lors de l'épidémie de NiV.[29]

MenV ne présente aucune antigénicité croisée avec aucun des genres de Paramyxovirinae excepté avec TiV récemment découvert.

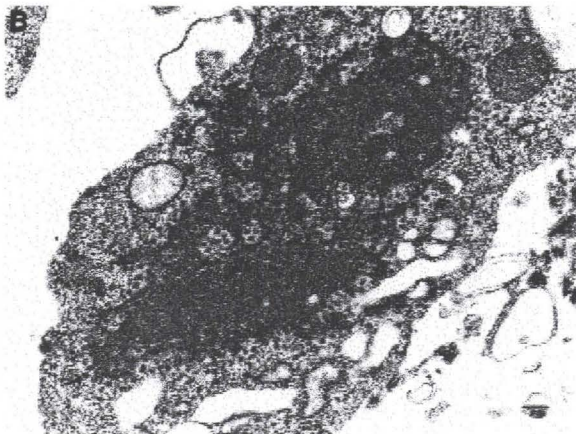
### 4.4. Propriétés enzymatiques : Activité neuraminidasique

MenV, à l'instar des autres Rubulavirus, ne possède que deux des six protéines responsables de l'activité neuraminidasique. Son activité est donc très faible voire nulle.

HeV et NiV ne possèdent pas cette activité.

### 4.5. Effet cytopathique

Après culture cellulaire, l'effet cytopathique est une formation syncytiale au bout de 24 heures de culture.



Effet cythopathique

## 5. Taxonomie [29],[24],[30],[17],[31]

En combinant les données ultrastructurales, aux données d'immunohistochimie, aux études sérologiques et aux études d'analyse génomique il a été possible proposer une classification des Paramyxoviridae. Cette classification est disponible en annexe 3.

## 6. Pathogénie [25]

La pathogénie reste mal connue, de nombreux points d'ombre persistent. Les auteurs se sont basés sur les données des Paramyxovirus déjà décrits comme le virus de la rougeole ainsi que sur les données de l'immuno-histochimie et de l'isolement viral. Mais cela reste hypothétique.

Le schéma de la pathogénie présumée est disponible en annexe 4.



## 7. Diagnostic

### 7.1. Clinique et lésionnel

Le tableau suivant résume les principaux signes cliniques des 3 virus servant au diagnostic clinique.

	HOMME	ANIMAL
HENDRA	Syndrome respiratoire ou Syndrome méningitique	Syndrome suraigu mort en 1 à 3 jours, hyperthermie Détresse respiratoire
MENANGLE	Syndrome grippal : myalgie céphalées Rash cutané	Troubles de reproduction Malformations congénitales
NIPAH	Syndrome encéphalitique Troubles nerveux importants +/- signes respiratoires	Syndrome respiratoire +/-Syndrome nerveux troubles du comportement

### 7.2. Epidémiologique [28],[32],[12]

La suspicion d'un patient atteint de NiV ou de HeV se fait par la présence de signes cliniques mais surtout par les données épidémiologiques. En effet, la clinique n'est pas pathognomonique.

Les facteurs de risque sont :

-Dans tous les cas, la localisation du patient dans zone de foyer avéré, le contact avec les chauves-souris : chasseurs, restaurateurs, personnel des enquêtes épidémiologiques.

-Pour HeV, les personnes ayant des contacts avec les chevaux atteints d'encéphalite : vétérinaires, éleveurs même si ces contacts rapprochés remontent à un an.

-Pour NiV, les personnes ayant des contacts avec des porcs vivants dans les porcheries où s'est déclarée la maladie : vétérinaires, porchers, militaires ayant participé à l'abattage [33] ou encore les personnes ayant des contacts avec les porcs abattus provenant d'une zone à risque: personnel d'abattoir[34].

### 7.3. De laboratoire

#### 7.3.1. Diagnostic virologique

##### 7.3.1.1. Précautions

Les virus Nipah et Hendra sont des agents biologiques de classe 4, ce qui impose des mesures de sécurité et pose une question essentielle de logistique lors d'une épidémie.

#### **7.3.1.2. Isolement viral**

L'isolement viral est indispensable lors de l'apparition d'un nouveau foyer afin de déterminer l'étiologie d'une pathologie dont la clinique n'est pas pathognomonique mais il impose d'extrêmes mesures de précaution lors des manipulations. L'isolement se fait sur cellules vero. [35]

Une fois isolé, il existe différentes méthodes d'identification que nous allons étudier.

#### **7.3.1.3. Immuno-histochimie [32]**

Il s'agit du test de détection le plus utilisé. Il est réalisé à partir de tissus formolés et ne présente donc pas de danger. De plus il a permis des études rétrospectives à partir des banques de prélèvements.

Les organes à tester sont dans la mesure du possible, les poumons, les nœuds lymphatiques médiastinaux, la rate, les reins et pour les animaux gestants, l'utérus, le placenta et les tissus fœtaux.

#### **7.3.1.4. Microscopie électronique [32],[36]**

Dans le cas d'un virus émergent la microscopie électronique est un examen de choix permettant d'identifier la famille auquel le virus appartient. On s'est ainsi aperçu de la ressemblance de Hendra avec les Paramyxovirus puis du virus Nipah avec Hendra et l'on a pu rapidement mettre au point un test diagnostique et orienter les recherches épidémiologiques.

On peut observer en culture, sur des coupes d'organes lésés des inclusions, des répliquations virales. On fait réagir sur des coupes de tissus des Ac qui vont se fixer sur les particules virales et on observe le complexe Ag/Ac au microscope.

#### **7.3.1.5. Biologie moléculaire : PCR et séquençage [32],[27],[37]**

Le diagnostic par RT-PCR peut être utilisé sur tissus frais ou fixés mais aussi sur LCR et sur les isolats provenant de cultures cellulaires. Il est très utile et permet après séquençage l'analyse de la souche virale.

### **7.3.2. Sérologie**

#### **7.3.2.1. ELISA [32],[38]**

La surveillance épidémiologique de ces virus nécessite une méthode de détection simple, rapide spécifique et n'utilisant pas les structures NSB4 trop lourdes à gérer.

Le Test ELISA permet un screening rapide avec des résultats assez spécifiques permettant la mise en évidence du passage d'un virus Nipah-like.

#### **7.3.2.2. Séroneutralisation [32]**

C'est le test standard de référence. Il est réalisé dans un laboratoire NSB4.

Il permet en outre de confirmer les résultats du test ELISA qui n'est pas suffisamment spécifique.

La séroneutralisation correspond à l'inhibition du pouvoir pathogène du virus par l'antisérum neutralisant spécifique. Elle permet d'évaluer le pouvoir neutralisant de



l'antisérum vis-à-vis du virus. On met la culture cellulaire en présence de l'antisérum à tester contenant éventuellement des anticorps neutralisant. On ajoute une solution de virus de concentration connue. Si il y a des anticorps neutralisant l'effet cytopathogène n'est pas présent car le virus va être inhibé. On évalue ce pouvoir en fonction du nombre de plaques syncytiales formées en culture cellulaire.

#### **7.4. Différentiel**

Chez le porc, le diagnostic différentiel inclut les maladies neurologiques pour Nipah et les troubles de la reproduction pour Menangle. [12]

Chez le cheval, le diagnostic différentiel de Hendra inclut toutes les maladies neurologiques et respiratoires suraiguës voir les mort subites.

Chez l'homme, toute cause de syndrome respiratoire aigu et encéphalite est à envisager dans le cadre du diagnostic différentiel particulièrement dans ces régions l'encéphalite japonaise et la West-Nile.

#### **8. Traitement [28],[39]**

Pour l'homme, il n'y a pas de traitement suffisamment efficace. La Ribavirine a été utilisée mais aucune analyse statistique n'a pu révéler significativement son efficacité. Le traitement est réduit au traitement symptomatique de réanimation.

On ne traite pas les animaux, on procède à l'abattage et à l'incinération.

#### **9. Pronostic, séquelles, complications [28]**

Pour les animaux le pronostic est très sombre car ils sont abattus.

Pour une infection à NiV chez une personne ayant développé les symptômes, le pronostic est sombre, le taux de mortalité atteint les 50%. Pour une infection à Hendra, à Menangle le faible nombre de cas ne nous permet pas de nous prononcer sur le pronostic.

Chez les patients gravement atteints, des complications mortelles telles que une septicémie, des hémorragies du tube digestif, une insuffisance rénale aiguë, un hémithorax, une embolie pulmonaire ou une fibrillation atriale causent la mort de l'individu.

Chez 8% des personnes ayant survécu à une encéphalite aiguë à NiV et chez 4% des personnes qui avaient une infection asymptomatique, une dégradation brutale au stade terminal a été observée. Ce cas s'est présenté aussi avec HeV.

25% des personnes guéries d'une infection à NiV présentent des déficits neurologiques notamment les personnes ayant présenté des troubles de la conscience lors de la phase aiguë de l'infection.

Un schéma résumant le pronostic est disponible en annexe 5.

#### **10. Epidémiologie**

Lors de l'émergence de nouveau virus, il y a un besoin urgent de comprendre les mécanismes épidémiologiques (réservoir, mode de transmission) afin de pouvoir adapter au mieux une réponse rapide et efficace pour enrayer l'épidémie et empêcher l'apparition de nouveaux foyers.



## **10.1. Espèces concernées**

Ce sont principalement les chevaux, les chauves-souris et l'homme pour Hendra, les porcs, les chauves souris et l'homme pour Nipah et Menangle. Cependant d'autres espèces présentent des traces du passage de l'infection comme par exemple les chiens, chats pour NiV. On ne peut exclure un passage chez d'autres espèces sauvages ou domestiques dans l'avenir.

## **10.2. Réservoir**

### **10.2.1. Hendra [8]**

Une hypothèse d'un réservoir sauvage est émise. Seront considérés comme réservoirs potentiels les espèces présentes aux deux foyers déclarés, capables de bouger entre les deux foyers, ou présentant une continuité de population entre les deux foyers ou ayant pu rentrer en contact avec des chevaux et ne présentant pas de troubles cliniques suite à l'infection. De ces critères de sélection ressortent deux espèces : les oiseaux migrateurs et les chauves-souris. La priorité est donnée à l'investigation des Chiroptères car le virus semble avoir un tropisme pour les mammifères. En premier lieu sont testées les chauves-souris malades ou blessées des centres de soins pour animaux sauvages. Ceci représente un échantillonnage ciblé permettant d'une part de faciliter la collecte et d'autre part de maximiser les chances de déceler le virus. En Avril 1996, des Anticorps anti-HeV sont détectés chez quatre genres de Pteropus dans l'état de Queensland.[40] On n'a pu isoler le virus que 6 mois plus tard dans l'appareil reproducteur d'un Pteropus gestante. Cet isolat est semblable en tout point à celui de HeV isolé sur chevaux.

L'enquête est poursuivie pendant deux ans avec un échantillonnage de 1043 spécimens. Le taux de séroprévalence fut de 47% à travers tout le pays. Des études rétrospectives sur les banques d'organes ont permis de déceler le virus sur des prélèvements datant de 1982. Au final, le virus a été isolé chez les quatre espèces de Pteropus présentes en Australie à partir des tissus fœtaux du sang. [41] Cette infection est donc à considérer comme endémique dans la faune sauvage Australienne.

Les Megachiroptères sont donc le réservoir naturel de HeV car ils tolèrent l'infection sans développer de pathologie même lors d'infections expérimentales.

### **10.2.2. Nipah [8],[35],[42]**

La surveillance de la faune sauvage afin de déterminer l'origine de la contamination des porcs a représenté un point clé du travail d'épidémiologie. Aux vues des similarités avec Hendra les recherches se sont portées sur les Megachiroptères.

21 individus appartenant à quatre espèces de Megachiroptères et à une espèce de microchiroptères se sont révélés positifs en sérologie NiV et le virus a été isolé à partir de prélèvements d'urine de Pteropus. Les Mégachiroptères sont donc le principal réservoir sauvage. D'autres espèces domestiques et sauvages ont été testées mais semblent être des cul-de-sac épidémiologiques et non pas des réservoirs.

### **10.2.3. Menangle**

Une grande colonie de chauve souris à tête grise et de chauve souris à tête rouge nichaient à 200m de la porcherie infectée. C'est pourquoi elles ont fait l'objet d'investigations. Au cours de l'étude préliminaire 42 des 125 sérums collectés étaient positifs au test de neutralisation. Par ailleurs on a détecté rétrospectivement la présence d'Anticorps sur des prélèvements effectués en 1996 avant l'infection des porcs. Ceci laisse supposer que les chauves-souris sont la première source du MenV. Le virus n'a cependant toujours pas été isolé chez les chauves-souris.

Les autres espèces dans le voisinage des porcheries infectées incluant rongeurs, oiseaux, bétail, moutons, chien et chat ne présentaient pas de trace du passage du virus.

### **10.2.4. Tioman**

Pour ce virus la démarche épidémiologique est inversée car on a isolé fortuitement ce virus à partir de l'urine de Pteropus lors d'une recherche de NiV. Ceci laisse présager que les Chauves-souris pourraient être réservoirs de plusieurs autres Paramyxovirus.

De plus, au Bangladesh, en Inde et au Cambodge l'existence de virus Nipah-like a été mise en évidence par sérologie chez des Megachiroptères mais les virus n'ont pas encore été isolés.

Les Megachiroptères semblent être le réservoir principal des Paramyxovirus de cette étude. Cependant il ne faut pas exclure l'existence d'autres espèces sauvages ou domestiques comme réservoir. [41]

Le réservoir principal identifié, il reste à déterminer le mode de transmission de la maladie ainsi que les matières virulentes. De là découleront les mesures de prophylaxie.

## **10.3. Mode de transmission**

### **10.3.1. Matières virulentes**

Les matières virulentes sont l'urine, la salive, les décharges nasales et la cavité orale. Les différents tissus sont aussi potentiellement contaminants notamment les annexes fœtales.[35, 43]

### **10.3.2. Transmission**

#### **10.3.2.1. Circulation du virus au sein du réservoir**

La circulation des virus chez les Megachiroptères est importante comme en témoignent les forts taux de séroprévalence lors des enquêtes. (43% pour NiV en malaisie) La transmission entre les individus semble se faire par voie respiratoire, ou par l'ingestion de fruits contaminés ou encore lors des parades sexuelles lors desquelles un comportement de léchage de la vulve est observé.[8] Lors du



part également l'émission dans la nature d'une charge virale importante peut être source de contamination. [44]

Des études expérimentales d'inoculation de HeV à des Pteropus ont révélé une transmission trans-placentaire. On peut étendre cette observation aux autres virus car il a été isolé dans le tractus reproducteur et les annexes fœtales.

#### **10.3.2.2. Transmission du réservoir aux hôtes sensibles**

La transmission du réservoir aux animaux domestiques et des animaux domestiques à l'homme est encore hypothétique. La contamination des chevaux ou des porcs semble être due à la consommation accidentelle de tissus fœtaux ou d'excréments de chiroptères via l'ingestion d'aliments contaminés. Une autre hypothèse faisant suite à l'isolement de virus dans les fruits partiellement mangés par les chauves-souris serait l'ingestion de noyaux contaminés dans les pâtures.[8]

#### **10.3.2.3. Transmission intraspécifique chez les hôtes sensibles**

##### **10.3.2.3.1. Hendra [18]**

La transmission intraspécifique de Hendra chez les chevaux est possible mais peu fréquente. Elle semble s'effectuer via le tractus respiratoire ou digestif. D'après l'étude de la transmission à Brisbane, une transmission mécanique est supposée via le contact avec le jetage nasal ou l'urine. Une hypothèse de transmission mécanique par un vecteur du genre Ixodes a été émise mais n'a pas été vérifiée. [45]

##### **10.3.2.3.2. Nipah [46]**

Le virus est hautement contagieux entre les porcs, la voie respiratoire est la voie de transmission car le confinement dans les porcheries expliquerait la circulation du virus. Les instruments du vétérinaire et de l'inséminateur semblent jouer un rôle de vecteur inerte. Le virus pourrait aussi passer via les semences et infecter un grand nombre de truies à partir d'un même verrat.

La transmission interhumaine est en théorie possible mais n'a encore jamais été démontrée.[47]

##### **10.3.2.3.3. Menangle**

L'hypothèse d'une transmission intra spécifique chez le porc via la voie respiratoire semble la plus évidente, on pourrait aussi incriminer la consommation des annexes fœtales lors du part.

##### **10.3.2.3.4. Mère/Fœtus**

La transmission verticale est évidente, les virus ont un tropisme pour le tractus reproducteur et le fœtus. Cette transmission semble avoir lieu pour tous les virus cités et pour toutes les espèces animales. [44]

## **11. Prophylaxie**

### **11.1. Médicale**

Aucun vaccin n'a été mis au point à ce jour.



### **3.1.3.1. Pteropus Rufus : (Tiedemann1808)[56]**

#### **3.1.3.1.1. Morphologie :**



#### **Pteropus rufus**

P. Rufus est une des plus grandes chauves-souris au monde avec une longueur totale de 25 cm environ et une envergure pouvant aller jusqu'à 1 m pour un poids de 600 g. La partie supérieure du corps orange ou jaune contraste avec la partie postérieure et le dos de couleur presque noire.

#### **3.1.3.1.2. Reproduction :**

Les femelles mettent bas d'un unique petit en Octobre.

#### **3.1.3.1.3. Communication**

Les individus communiquent entre eux par des vocalisations notamment lors de la période de reproduction.

#### **3.1.3.1.4. Habitat :**

Ils se perchent dans de grands arbres (25m de haut en moyenne), souvent près d'une rivière ou de la mangrove. Les Pteropus préfèrent la côte et colonisent rarement les hautes terres centrales. Les perchoirs sont situés dans des zones ayant un certain niveau d'humidité, un climat doux, à l'abri des vents violents et dans des endroits dégagés et en surplomb permettant un décollage rapide. [57] Les perchoirs sont bruyants et comprennent entre 10 et 5000 individus.

Une grande variation saisonnière est observée : en saison sèche, les perchoirs comptent beaucoup moins d'individus. Ceci est à mettre en relation avec la raréfaction de la nourriture. [57] Les grandes colonies se font de plus en plus rares. En effet, les Pteropus sont un met apprécié des Malgaches et la viande de chauve-souris est chère. Ceci encourage la chasse. D'autre part, on assiste à la disparition des perchoirs ; un cyclone ou la déforestation qui va bon train sur l'île font disparaître peu à peu ces gîtes naturels.[57] Dans certaines régions, croyances et traditions limitent la chasse, comme c'est le cas dans l'Ankarana, dans d'autres régions au contraire les « Fanihy » sont très appréciées et chassées malgré l'interdiction formelle de chasse des espèces endémiques. On estime à 200000 le nombre de Pteropus rufus à Madagascar, cette espèce est donc considérée à bas risque de disparition par l'IUCN mais les dernières observations montrent un déclin inquiétant. Pteropus rufus entre dans la liste des espèces protégées de Madagascar par son rôle important dans l'écosystème en matière de pollinisation.[54]

## **11.2. Sanitaire**

### **11.2.1. Offensive**

En cas de déclaration d'un foyer de NiV, de MenV ou de HeV, l'abattage et l'isolement des animaux sont préconisés car ces maladies ont toutes un caractère zoonotique mortel. Dans le cas de NiV les chiens et chats doivent être aussi abattus. Les carcasses sont incinérées.[33] La désinfection des locaux et du matériel doit être réalisée. Des restrictions de mouvements des animaux doivent être immédiatement mises en place pour prévenir l'apparition de nouveaux foyers comme ce fut le cas en Malaisie.

L'interdiction d'exportation des animaux d'un pays touché doit être mis en place.

La maladie doit être déclarée le plus vite possible à l'OIE et à l'OMS afin de prévenir les autres pays du risque.

Toutes ces mesures nécessitent l'intervention rapide et efficace des pouvoirs publics, une capacité à réagir correctement. La législation doit bien sur être adaptée à l'émergence de pathogènes.

### **11.2.2. Défensive**

#### **11.2.2.1. Protection des personnes à risque**

Les personnes à risque doivent prendre des mesures de protection et éviter le contact avec les animaux malades ou leurs sécrétions. [48] Ainsi le personnel d'abattoir, l'éleveur, le vétérinaire, les militaires chargés de l'abattage doivent porter des gants, des lunettes, un masque. Des règles d'hygiène strictes doivent être appliquées chez le personnel soignant, lors des actes vétérinaires ou d'insémination.[49]

#### **11.2.2.2. Prévention de l'infection**

Pour empêcher la transmission au sein d'une porcherie, des grillages doivent être mis en place pour éviter tout contact avec les chauves-souris commensales. Les colonies nichant près des porcheries doivent être chassées.

De plus, la séparation des classes d'âge au sein de l'élevage permet d'éviter la transmission de Menangle.

#### **11.2.2.3. Détection précoce**

Dans les abattoirs, l'inspection ante-mortem doit être améliorée, les inspecteurs vétérinaires doivent être formés à reconnaître la maladie.[34]

Ces nouveaux virus doivent impérativement entrer dans le diagnostic différentiel des encéphalites porcines ou humaines, des morts subites ou des syndromes aigus chez le cheval, des troubles de la reproduction chez le porc.[34]

Les vétérinaires et les éleveurs doivent donc être sensibilisés. Des campagnes d'information et d'éducation ont été entreprises auprès des éleveurs afin d'améliorer la détection des maladies ainsi que la protection des éleveurs.

#### **11.2.2.4. Contrôle de la circulation virale [50],[51]**

Des élevages sentinelles pourraient également être mis en place pour assurer un contrôle permanent de la circulation de la maladie zone d'émergence.

Un contrôle régulier du réservoir doit avoir lieu. Des études doivent être menées pour évaluer la prévalence des virus chez les Megachiroptères, la répartition, la biologie, l'habitat, le mode de vie et le changement de l'environnement des chiroptères.

### **12. Répartition**

Les foyers de Hendra se limitent à l'état du Queensland en Australie, cependant le virus a été isolé chez les Pteropus sur tout le territoire Australien.

Les foyers Nipah s'étendent en Malaisie et à Singapour.

Les foyers de Menangle sont limités au New South Wales en Australie.

Pour l'instant la répartition de Tioman se limite à son lieu de découverte : l'île Tioman en Malaisie.

Cependant, en Inde, en Indonésie et au Cambodge des traces sérologiques de virus Nipah-like ont été détectées chez des Pteropus. Ceci laisse envisager une répartition beaucoup plus large des Paramyxovirus. Il sera donc intéressant de chercher des traces de ces virus sur l'ensemble des aires de répartition des Megachiroptères de la famille des Pteroptidae. Ces deux aires de répartition seront sans doute superposables.



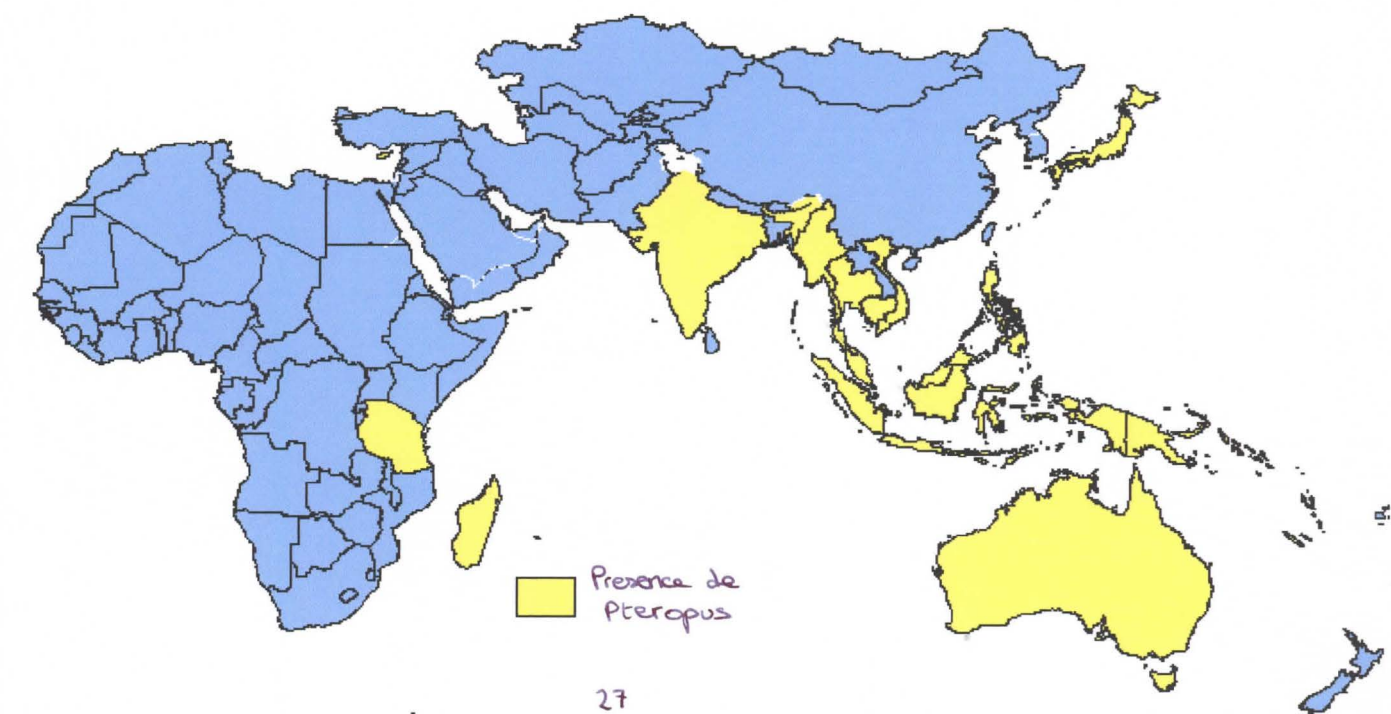
## TROISIEME PARTIE : SURVEILLANCE DU RESERVOIR DE PARAMYXOVIRUS A MADAGASCAR

## 1. Problématique à l'échelle internationale

La distribution géographique des Paramyxovirus se limite à leur pays de découverte. [1] En effet les études de distribution sur ces pathogènes restent très limitées: d'une part il s'agit de pathogènes émergents récemment découverts et d'autre part le fait d'être des pathogènes de groupe de risque 4 limite la diffusion de souches de laboratoire nécessaires à la préparation de réactifs de diagnostic. Cependant, des cas humains d'infection à virus Nipah-like auraient été confirmés sérologiquement au Bangladesh et en Inde (Promed 20020830.5187 et 20030106.2309). Deux enquêtes sérologiques ont montré des traces d'infection à virus Nipah-like au Cambodge sur des échantillons de chauves-souris du genre *Pteropus* (Olsen et al, 2002; Reynes JM, données non publiées) et leur absence sur des échantillons de chauves-souris appartenant à d'autres genres (Reynes JM, données non publiées). Il serait donc important de pouvoir compléter l'aire de distribution de ces virus émergents.

Il est vraisemblable que la distribution géographique des ces Paramyxovirinae se superposera en partie ou totalement avec celles des chauves-souris du genre *Pteropus*. Le RIPIA est bien placé pour répondre à cette question puisque plusieurs Instituts Pasteur se trouvent sur la zone de distribution des chauves-souris du genre *Pteropus*. Ainsi les Instituts Pasteur d'Ho Chi Minh Ville, de Madagascar et du Cambodge couvrant cette zone, se sont engagés en collaboration avec l'Unité de biologie des virus émergents de l'Institut Pasteur à Paris, délocalisée à Lyon à compléter l'aire de distribution des Paramyxovirus et peut être à en isoler de nouveaux.

Distribution mondiale des *Pteropus spp* (d'après Koopman, 1993)



## **2. Objectifs :**

### **2.1. Principal :**

-Compléter l'étude de l'aire de répartition des Paramyxovirus.

### **2.2. Secondaires**

-Constituer une banque d'organes de Chiroptères pouvant être utilisés en parasitologie, en virologie.

-Mettre au point des tests diagnostiques de détection des Paramyxovirus pouvant être utilisés chez l'homme dans le cadre de diagnostics différentiels.

-Mettre en place une collaboration entre différents instituts du réseau international des Instituts Pasteur et Instituts Associés et permettre en place un réseau d'épidémiologie dans ces zones.

-En cas de mise en évidence d'un nouveau Paramyxovirus, une étude plus complète du virus (séquençage complet, études biologiques) serait envisagée, de nouveaux réactifs seraient préparés avec ce virus pour améliorer les outils de diagnostic.

## **3. Cas particulier de Madagascar :**

Madagascar est située à l'extrême ouest de la zone de répartition des Pteropus, Pteropus Rufus est endémique à Madagascar, il serait intéressant de connaître l'éventuelle existence d'une circulation virale. En effet du point de vue phylogénie, il sera très intéressant de dater la co-évolution des Paramyxovirus et des Megachiroptères d'après les connaissances concernant la spéciation de Megachiroptères. [52]

Par une première enquête sérologique il faudra mettre en évidence le passage de ces virus au sein des populations de Megachiroptères à Madagascar. Si nos recherches s'avèrent fructueuses, notre travail consistera dans un deuxième temps à isoler et à caractériser ce ou ces nouveaux virus.

Avant tout, il faut constituer un échantillonnage de sérums et d'organes de Megachiroptères ; ce fut l'objectif principal de notre travail de terrain.

Afin de préparer au mieux la mission de capture des Megachiroptères, il est indispensable de connaître, leur biologie, leur habitat et leur mode de vie.

### **3.1. Généralités sur les Mégachiroptères de Madagascar**

#### **3.1.1. Classification**

Les espèces de chauves-souris représentent près de 20% de la totalité des espèces de mammifères à la surface du globe.

Elles appartiennent à l'ordre des Chiroptera. Ce mot vient du grecque : cheiros qui signifie main et Pteros qui signifie aile. L'ordre des chiroptères est le plus représenté après celui des Rodentia (rongeurs). [53]



### **3.1.2. Généralités sur les chauves-souris à Madagascar [52]**

Les premières descriptions de chauves-souris à Madagascar datent de 1803. Sept familles ont été observées. Depuis 30 espèces appartenant à 16 genres différents ont été décrites parmi lesquelles 18 sont endémiques sur l'île. Les genres Eilodon, Triaenops ont une origine afrotropicale tandis que le genre Pteropus vient d'Asie et existe actuellement en Asie du sud est, Asie mineure et en Australie . Il reste cependant de nombreuses espèces non décrites. Près de 60% des espèces de chauves-souris sont endémiques, même si des phénomènes de convergence sont observés notamment avec les espèces d'Asie et d'Amérique latine. Ceci s'explique sans doute par l'isolement de l'île.

#### **3.1.2.1. Habitat**

On distingue trois types d'habitats pour les chauves-souris : les arbres à feuilles des forêts, les grottes et les habitations humaines pour les espèces commensales. Les chauves-souris sont menacées par la disparition de leurs habitats. A Madagascar, les habitats privilégiés sont les grottes que l'on retrouve dans l'Ankarana, le Bemaraha et le Sarodrano. Les Megachiroptères, Eilodon et Pteropus sont plutôt forestiers mais avec la déforestation et la chasse en vue de leur consommation ces genres sont menacés. [52]

#### **3.1.2.2. Rôle des chiroptères frugivores dans l'écosystème [54]**

Les chauves-souris se déplaçant sur de grandes distances (plusieurs dizaines de kilomètres en une nuit), elles participent à la dissémination du pollen et des graines via leurs fèces d'une grande partie des plantes de la forêt tropicale et des baobabs. Leur rôle est indiscutable ce qui leur vaut d'être protégées même si la population malgache pense toujours que ce sont des animaux nuisibles pour les cultures.

#### **3.1.3. Description des différentes espèces de Megachiroptères [54]**

L'ordre des Megachiroptères compte une seule famille : les Pteroptidae. Cette famille comprend environ 170 espèces. La grosseur de leurs yeux les distingue de la famille des Microchiroptères. [55]

On les trouve en Afrique, en Asie et en Australie. (Cf carte de répartition). Ce sont des herbivores se nourrissant de fruits, de nectar, du pollen, de feuilles. Ils se déplacent et cherchent leur nourriture par la vue à l'exception du genre Roussetus qui possède un système d'« echolocation » ce qui leur permet de vivre dans des grottes. Les trois espèces de Megachiroptères présentes à Madagascar sont endémiques et appartiennent aux trois genres suivants:

Pteropus, originaire d'Asie est le plus grand

Eilodon de taille moyenne est présent en Afrique et à Madagascar

Roussetus de petite taille est présent aussi bien en Afrique, qu'à Madagascar ou qu'en Asie.

Une fiche de diagnose est disponible en annexe 6.



### **3.1.3.2. Eilodon dupreanum : (Pollen 1866)[56]**

#### **3.1.3.2.1. Morphologie :**



#### **Eidolon dupreanum**

Plus petit que Pteropus, Eilodon mesure 20 cm de long, avec une envergure de 90 cm et pèse 300g environ. On distingue les males par leur taille (10% de plus que pour les femelles) et par le collier pourpre qu'ils ont autour du cou. Leur tête est plus allongée que celle des autres Megachiroptères de Madagascar.

#### **3.1.3.2.2. Habitat :**

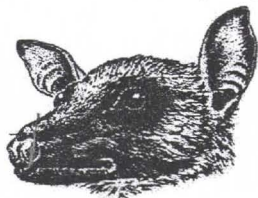
Les Eilodon nichent dans les falaises, dans les grottes et dans les branchages des arbres très feuillus. On peut même en trouver dans les hautes terres du centre. Les colonies comptent de 10 à 500 individus avec une moyenne de 200. Durant la saison sèche certaines niches diminuent ce qui laisse penser à d'éventuelles migrations. Leur capacité à vivre sur les hautes terres ainsi que leur capacité à persister malgré la chasse, permet d'ôter pour l'instant toute inquiétude d'extinction.[54]

#### **3.1.3.2.3. Reproduction :**

Les femelles donnent naissance à un petit en Décembre-Janvier.

### **3.1.3.3. Roussettus madagascariensis : (Grandidier 1928)[56]**

#### **3.1.3.3.1. Morphologie :**



#### **Roussettus Madagascariensis**

Les Roussettes émettent de petits sons haut perchés en claquant leur langue ce qui est une forme simple du radar.

Les roussettes de Madagascar sont très petites, ce qui les distingue des autres Mégachiroptères.

Elles ne pèsent que 70 g pour une longueur de 14cm et une envergure de 40 cm.

Leur tête est marron gris foncé et la partie postérieure est plus claire. Il ne faut pas les confondre avec des microchiroptères lors du vol, leurs yeux brillent à la lumière de la torche et leur trajectoire est rectiligne à la différence de celles des microchiroptères.

#### **3.1.3.3.2. Habitat :**

Les Roussettes vivent dans les grottes particulièrement celles de l'Ankarana, de Bemaraha et d'Anjohibe. On les trouve également dans les forêts exception faite des forêts de pins du Sud-Ouest.

Les perchoirs regroupent près de mille individus.

#### **3.1.3.3.3. Reproduction :**

En Juin, une femelle donne naissance à un petit.

Maintenant que nos connaissances concernant les chiroptères sont acquises, il sera plus aisé de préparer des campagnes de capture.

### **3.2. Matériel et méthodes :**

#### **3.2.1. Capture des chauves-souris**

Une mission a eu lieu du 10 mai au 20 mai 2003. L'Institut Pasteur a collaboré avec le WWF lors d'une mission dirigée par Steeve Goodman, naturaliste et zoologiste.

Le calendrier, la présentation de l'équipe et du matériel de mission sont en annexes 7,8,9.

##### **3.2.1.1. Objectifs de la mission**

###### **3.2.1.1.1. Etude morphométrique (Fields Museum Chicago)**

Le WWF mandaté par le Fields muséum de Chicago avait pour but d'étudier chaque espèce de chiroptères capturés à la sortie des grottes dans le massif de l'Ankarana notamment en ce qui concerne les caractéristiques morphométriques et la description de nouvelles espèces.

###### **3.2.1.1.2. Etude d'impact environnemental (WWF)**

De plus une étude comportementale de l'impact du tourisme sur la biologie des chiroptères était réalisée par Scott Cardiff, un biologiste. Son travail consistait à observer les colonies, les dénombrer, puis à baguer un maximum d'individus afin de mieux étudier leur comportement.

###### **3.2.1.1.3. Etude virologique (IPM)**

Il fallait donc réaliser des prélèvements sanguins ainsi que des prélèvements d'organes afin de constituer une banque de prélèvement suffisamment importante en vue d'être utilisée par différentes études.

##### **3.2.1.2. Préparation de la mission**

###### **3.2.1.2.1. Logistique**

Le départ en mission, n'est pas simple à organiser. Il fallait s'assurer de l'approvisionnement du matériel, prévoir le transport, l'acheminement du matériel et des personnes sur le lieu de capture. Il fallait aussi gérer l'intendance car l'eau et la nourriture n'étaient pas disponibles sur le site de capture.

###### **3.2.1.2.2. Capture d'entraînement dans le parc de l'IPM**

Afin de mettre au point les méthodes de capture et de prélèvement, une nuit de capture a été réalisée au sein du parc de l'IPM. Il y avait en effet, dans le parc un figuier qui représentait une source de nourriture pour les roussettes. C'est pour cette raison mais aussi pour des raisons de commodité que nous avons choisi ce lieu pour la capture d'entraînement. Les participants étaient Steeve Goodman, Dominique Rousset et moi-même. Les filets furent posés avant la tombée de la nuit près des points d'abreuvement des chauves-souris. Aucun spécimen ne fut capturé.



Cependant cette séance a permis de m'initier aux techniques de pose et de rangement, des filets et de la harpe.

### **3.2.1.2.3. Autorisation de capture et formalités**

Les chauves-souris étant des espèces endémiques à Madagascar elles sont protégées : leur capture est donc interdite. En outre l'Ankarana est une réserve dite réserve spéciale, pour y accéder il faut donc obtenir une autorisation spéciale auprès du Ministère des Eaux et Forêts. Pour la capture dans le parc de l'IPM ainsi que pour l'Ankarana, nous avons obtenu cette autorisation qui limite le nombre de spécimens sacrifiés à 5 par espèce et par grotte. De plus un droit d'entrée pour les chercheurs est obtenu auprès de l' Association Nationale pour la Gestion des Aires Naturelles Protégées (Angap)

### **3.2.1.3. Lieu de capture**

Le massif de l'Ankarana est situé au nord de la grande île, à une centaine de kilomètre au Sud-ouest de Diego-Suarez.

Il est classé réserve spéciale c'est-à-dire que l'on peut parcourir la réserve mais que l'agriculture, la chasse et le débitage sont prohibés. Il englobe une région sauvage et aride d'où émergent des tsingys, surprenantes formations rocheuses d'origine corallienne. Ce massif renferme de nombreuses grottes qui constituent l'habitat de multiples colonies de chiroptères insectivores et frugivores.

Les coordonnées GPS des sites de captures sont référencées en annexe.



**massif de l'Ankarana**



**carte de l'Ankarana et localisation des campements**

### **3.2.1.4. Méthodes de capture[58]**

Les captures ont lieu la nuit, les pièges sont installés en fin d'après-midi afin d'être prêts au crépuscule. En effet les chauves-souris connaissent deux pics d'activités : un à la tombée de la nuit quand elles partent se nourrir et un second vers 3h du matin quand elle rentrent au gîte.



Cependant l'horaire de sortie dépend de l'espèce, ainsi on distingue plusieurs vagues de sortie de 17h30 à 19h. Les captures n'auront lieu que pour la sortie des animaux. Les individus sont capturés à l'aide de 2 types de pièges : le filet et la harpe.

Le choix de l'une ou l'autre méthode dépend de la configuration de la grotte, du type de chauves souris que l'on prévoit de capturer.

Le filet de nylon d'une longueur de 9 ou 12m permet de balayer une plus grande surface. Il est tendu entre 2 bambous. Son maniement requiert une certaine expérience quant à la façon de le poser, de le tendre, de le ranger et de le réparer. Cependant il est très fragile et implique qu'une ou plusieurs personnes soient constamment prêtes à sortir les animaux du filet avant qu'ils ne le détruisent. Il peut atteindre 2.50 m de hauteur et convient donc pour des ouvertures de grotte basses comme ce fut le cas dans le 3<sup>ème</sup> canyon ou encore en forêt dans les couloirs naturels formés par la végétation.

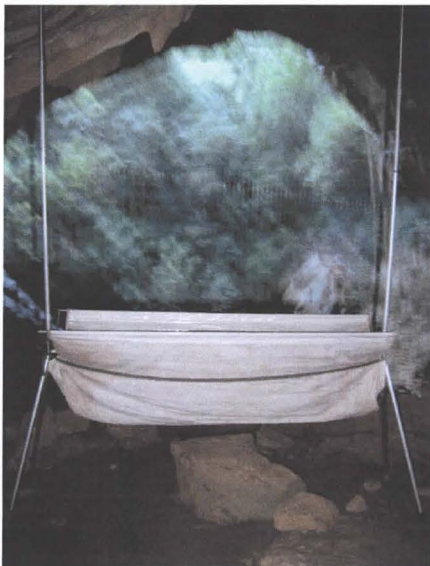
La harpe ou « harp traps » est un piège mécanique simple.

Des fils de nylon, fils de pêches, sont tendus dans un cadre métallique. Les animaux ne détectent pas les fils, se cognent et tombent dans un panier qui forme un cul de sac. Les chauves-souris ne peuvent remonter et nous pouvons les ramasser dans ce panier.

La harpe présente l'avantage d'être moins détectable par les animaux, d'être plus haute que le filet (hauteur ajustable jusqu'à 4m). Par contre elle est encombrante, difficile à transporter dans les Tsingy et ne couvre qu'une largeur réduite à 3m.

Elle sera donc utilisée dans les ouvertures étroites, dans des couloirs de vol des chauves-souris, comme ce fut le cas dans la grotte des chauves-souris ou encore à Andrafiabe.

Une fois les chauves-souris prises au piège, il faut les immobiliser et les mettre à l'intérieur d'un pochon de tissu en attendant de les baguer. Pour ce travail, il faut se munir de gants de cuir afin d'éviter les morsures qui peuvent être douloureuses ou transmettre des maladies. La méthode de contention est expliquée en annexe 11.



**piège harpe à l'entrée de la grotte aux chauves souris**



**filet au campement d'Andrafiabe**

### **3.2.2. prélèvements**

#### **3.2.2.1. Prélèvements des animaux qui seront relâchés**

Ces animaux sont pesés, mesurés, bagués. Un prélèvement sanguin est réalisé à la veine du patagium sur les Megachiroptères puis elles sont relâchées. Le sang est stocké dans des tubes Eppendorf et sera centrifugé le lendemain matin. Un frottis est réalisé dans la mesure du possible pour l'unité paludisme.

#### **3.2.2.2. Dissection et réalisation des prélèvements pour animaux sacrifiés**

5 individus de chaque espèce sont stockés vivants au frais dans les pochons en attendant le petit matin d'être disséqués.

Le port de gants, de masque et de lunette de protection était indispensable aux vues de la pathogénicité des virus avec lesquels on pouvait rentrer en contact

Les dissection sont effectuées sur une table en bois sur le site de camping mais à l'écart des l'intendance et des tentes. Le protocole est le même pour tous les individus :

- Sortir l'animal du pochon
- déterminer l'espèce
- Faire un prélèvement sanguin intracardiaque à l'aide d'une aiguille verte après désinfection du thorax à l'alcool à 70°
- verser le sang dans un tube Eppendorf
- Réaliser un frottis sanguin, laisser sécher et fixer au méthanol
- prélever la gorge uniquement sur les Megachiroptères avec un écouvillon stérile et mettre dans un milieu de transport virologique dans un cryotube
- rechercher les parasites externes et les mettre dans de l'alcool à 90°
- prélever les fèces en vue de l'étude du régime alimentaire
- mesurer et peser l'animal (cf fiche de renseignements en annexe)
- sexer et déterminer l'âge
- prélever un bout du grand pectoral
- séparer la tête du corps et dépouiller la tête
- prélever les yeux et les mettre dans un tube contenant de l'alcool à 90°
- identifier le corps et la tête par des étiquettes accrochées aux mandibules et à l'aile
- prélever cerveau à l'aide d'une curette par le trou occipital et mettre dans un cryotube
- mettre le crâne dans de l'alcool à 90°
- prélever les glandes salivaires, les mettre dans le même cryotube que le cerveau
- dépouiller la partie abdominale avec une lame de scalpel et des ciseaux
- vérifier dans la cavité abdominale la présence de filaires, les mettre dans de l'alcool à 90°
- prélever les reins et les mettre dans un second cryotube (tube nunc)
- prélever la rate et la mettre dans ce même cryotube
- prélever le foie et le mettre dans un troisième cryotube
- prélever les poumons en passant par le diaphragme et les mettre dans ce même cryotube
- mettre la dépouille dans le formol
- remplir la feuille « compte rendu de capture » (cf modèle en annexe)



### **3.2.2.3. Traitement des prélèvements**

- stocker immédiatement les prélèvements contenus dans les cryotubes dans les containers d'azote liquide à moins 80°C
- centrifuger les tubes de sang 15 minutes à 5000 tpm à température ambiante
- récupérer le sérum au pipetman et le transférer dans un cryotube
- récupérer le culot et le mettre dans de l'alcool à 90°
- stocker les cryotubes à -80°C
- une fois de retour à l'institut les tubes sont triés et transférés dans un congélateur à moins 80°C

### **3.2.2.4. Devenir des prélèvements**

Les filaires sont destinées au Muséum d'histoire naturelle de Paris (MNH) pour des études taxonomiques et phylogénétiques

Les poumons pourraient être envoyés au MNH pour une étude phylogénétique des pneumocystis.

Les parasites externes sont envoyés au Cermes au Niger à un entomologiste.

Le cerveau et les glandes salivaires seront utilisés pour l'étude des Henipahvirus et des Lyssavirus par inoculation intracérébrale à des souris. Les sérums seront testés en ELISA

Les cerveaux et les carcasses seront utilisés pour des études morphométriques au muséum d'histoire naturelle de Chicago.

Les prélèvements musculaires serviront à des études génétiques et taxonomiques.

Les yeux sont envoyés en Allemagne pour des études sur la vision des chiroptères.

Le caillot sanguin et le frottis serviront pour l'étude des hémoparasites.

Tout ceci nous montre l'étroite collaboration entre les chercheurs du monde entier mais aussi la nécessité de rentabiliser au maximum la mort d'espèces protégées.

### **3.2.3. Analyses des prélèvements**

La recherche des anticorps de type IgG spécifiques de chaque Paramyxovirus a été effectuée par technique immunoenzymatique ELISA directe optimisée dans les conditions de travail du laboratoire de l'IPM.

#### **3.2.3.1. Méthode : protocole d'Elisa**

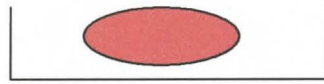
##### **3.2.3.1.1. Principe général : [59]**

L'antigène est fixé sur un support solide (plaque de polystyrène).

Le sérum à tester est incubé. Si l'anticorps spécifique est contenu dans le sérum, il va se lier à l'antigène adsorbé sur la plaque. Puis on incube la protéine AG conjuguée à la peroxydase qui va se fixer sur la partie non spécifique de l'anticorps. La révélation se fait en ajoutant le substrat de la peroxydase qui engendre une réaction colorée. Les différences de densité optique seront lues au spectrophotomètre à 450 et 620 nm.

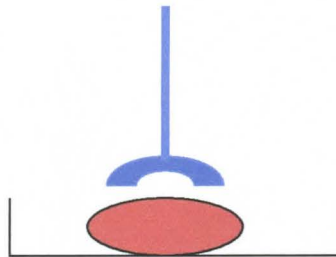
Schématisation du test ELISA

**Sensibilisation de la plaque avec Antigène viral**



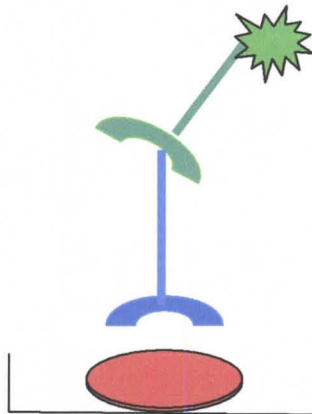
**Incubation 24h puis Lavage au PBS Tween**

**Ajout du sérum à tester Anticorps antiviral**



**Incubation 1 h à 37°C Lavage au PBS Tween**

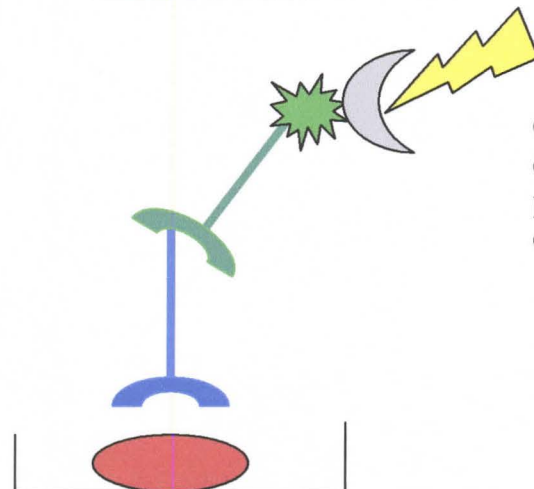
**Dépôt de la protéine A/G conjuguée avec la peroxydase se fixe sur la partie non spécifique de l'Ac**



**Incubation 1 h à 37°C**

**Ajout du substrat de la peroxydase TMB Réaction enzymatique de clivage**

**Arrêt de la réaction au bout de 10 min avec Acide phosphorique**



**Clivage du conjugué en produits colorés**

**LECTURE AU SPECTROPHOTOMETRE**



### **3.2.3.1.2. Les différentes étapes de la réaction**

#### **3.2.3.1.2.1. Sensibilisation des plaques par l'antigène à J1 :**

L'antigène qui a été préparé à partir de cultures cellulaires à l'unité de biologie des virus émergents est distribué dans les puits d'une plaque Polysorb. Les puits des colonnes paires de la plaque reçoivent 100 µl de l'antigène avec virus dilué au 1/4000 dans du PBS pH 7,2 et les puits des colonnes paires reçoivent 100 µl de l'antigène sans virus dilué au 1/4000 dans le même tampon. La plaque est incubée au minimum une nuit à + 4°C puis lavée avec du tampon PBS Tween 20 0.05% afin d'éliminer les produits non fixés.

#### **3.2.3.1.2.2. Fixation de l'anticorps J2 :**

Deux dilutions successives des sérums sont effectuées au 1/10 sur des plaques de microtitration 96 puits à fond rond. Un témoin positif et trois témoins négatifs y sont inclus. Le diluant utilisé est un mélange de PBS Tween 20 et de lait à 3%.

Les sérums dilués au 1/100 sont déposés en duplicate sur la plaque sensibilisée. 100µl sont déposés dans le puits contenant l'antigène positif et 100µl sont déposés dans celui contenant l'antigène négatif.

L'incubation se fait pendant une heure à 37°C puis les matériaux non fixés sont éliminés par lavage au tampon PBS Tween.

#### **3.2.3.1.2.3. Dépôt du conjugué :**

La protéine A/G conjuguée à la peroxydase utilisée diluée au 1/10000 dans le tampon de dilution est à son tour déposée dans les puits à raison de 100µl par puits.

L'incubation se fait pendant une heure à 37°C puis les matériaux non fixés sont éliminés par lavage au tampon PBS Tween.

#### **3.2.3.1.2.4. Révélation de la réaction :**

Le substrat, la 3,3',5,5'-tetraméthylbenzidine (TMB ; SigmaR) est déposé dans chaque puits sous un volume de 100 µl. Au bout de 10 minutes la réaction est arrêtée par adjonction de 50 µl d'acide phosphorique.

Ce substrat est le substrat de la peroxydase qui va se cliver en présence de l'enzyme et va donner des produits colorés.

#### **3.2.3.1.2.5. Lecture et interprétation des densités optiques**

Les densités optiques sont lues à 450 nm/620 nm pour le TMB. Les densités optiques sont ensuite saisies sur un tableur excel (Microsoft) qui calcule pour chaque échantillon  $\Delta DO$  ( $DO$  puits Ag avec virus -  $DO$  puits Ag sans virus).

Le seuil de positivité est égal à la moyenne  $\Delta DO$  des témoins négatifs + 3 écarts types arrondi au 1/10 supérieur.

### 3.3. Résultats

#### 3.3.1. Réalisation d'une collection de sérums :

Au cours de la mission au total 56 sérums ont été récoltés 28 de Microchiroptères et 28 de Megachiroptères. Une banque d'organes de Microchiroptères et de Megachiroptères est désormais disponible à l'IPM. Le tableau suivant fait état de cette banque d'organes. Elle comprend la collection initiale que possédait déjà l'IPM ainsi que celle collectée lors de la mission.

ESPECE	COLLECTION INITIALE	MISSION	TOTAL
hipposideros commensoni	11	1	12
myotis goudoti	55	12	67
trianops rufus	33	22	55
trianops furculus	24	10	34
miniopterus	19		19
miniopterus manavi	90	22	112
miniopterus gleni	4	10	14
otomops madagascariensis	19	5	24
tadarida jugularis	12	16	28
tadarida leucostigma	67	0	67
tadarida	8	0	8
emballonura atrata	0	4	4
eidolon duprenum	1	2 (37 sera)	3
roussettus madagascariensis	24	9	33
			480

total microchiroptères	444
total megachiroptères	36

bilan collection  
chiroptères

25-mai-03

La collection de sérum est insuffisante, elle devra être complétée avant de réaliser le screening sérologique. En effet, afin de standardiser au maximum les résultats, les tests ELISA seront réalisés une fois le nombre de prélèvements suffisants pour avoir des résultats significatifs. De plus, le screening se fera pour les quatre virus en même temps pour ne pas faire subir aux sérums de nombreuses variations de températures. Or les antigènes ne sont pas tous encore disponibles. Nous n'avons reçu que l'antigène de NIV.



### **3.3.2. Mise au point du test**

La mise au point de ce test concerne uniquement l'antigène NiV que nous avons reçu. L'IPM attend les antigènes de MenV, HeV et TiV.

La dilution d'antigène optimale a été déterminée en testant des sérums témoins, positifs vis-à-vis d'une gamme de dilution allant de 1/1000 à 1/4000.

La dilution optimale trouvée est de 1/4000.

La dilution de la protéine AG est optimisée. Les dilutions 1/ 2500, 1/5000 et 1/10000 ont été testées. La dilution optimale trouvée est 1/10000.

Pour les trois autres virus le principe sera exactement le même.

Les dilutions optimales trouvées sont donc :

-1/4000 pour l'antigène

-1/10000 pour la protéine AG.

### **3.4. Discussion**

#### **3.4.1. Difficultés techniques et logistiques**

##### **3.4.1.1. Pour la préparation de la mission**

J'étais chargée de préparer et de lister le matériel nécessaire à la mission. J'ai surestimé la quantité du matériel. Concernant l'approvisionnement, il a fallu faire face à de grosses difficultés : les aiguilles de pédiatrie ne sont pas disponibles sur l'île il fallait les commander en France ou à la Réunion.

La centrifugeuse à main commandée pourtant un mois à l'avance n'est pas arrivée à temps, il a donc fallu transporter un groupe électrogène en dernière minute, ce qui a alourdi la gestion.

Si la capture organisée dans le parc avait été fructueuse, il aurait été plus facile de se rendre compte des besoins en matériel. Cela aurait beaucoup aidé l'organisation.

Une autre difficulté à laquelle il a fallu faire face a été le poids des démarches administratives. Il existe un ordre pour effectuer ces démarches auquel il convient de se plier. Cette rigueur est indispensable cela m'a appris à m'organiser et à anticiper.

##### **3.4.1.2. Pendant la mission**

Pour la réalisation des frottis, les conditions n'étaient pas idéales : le vent séchait instantanément la goutte de sang et des poussières empêchaient de l'étaler correctement.

Le « laboratoire » de plein air ne permettait pas d'assurer une asepsie correcte.

Le laboratoire installé au premier campement était en pleine forêt. Lors des dissections, de nombreux insectes perturbaient le bon déroulement des opérations.

Il aurait fallu prévoir de travailler sous moustiquaire.

### **3.4.2. Difficultés d'obtention de prélèvements**

#### **3.4.2.1. Pendant cette mission en particulier**

L'étude de Scott Cardiff était une étude comportementale et mon travail de prélèvement perturbait cette étude. Il était donc difficile de mener en parallèle ces deux études.

Sur le terrain, il n'y avait que 2 grottes où nichaient les Megachiroptères : la grotte des Chauves Souris abritait les Roussettus et la grotte du 3<sup>ème</sup> Canyon les Eidolon.

Le nombre d'animaux que l'on pouvait euthanasier était limité à cinq individus par espèce et par grottes par le ministère des eaux et forêts.

Les captures n'avaient lieu que pendant la sortie des chiroptères de 17h30 à 21H car les moyens logistiques et les « fady » croyances locales ne nous permettaient pas de rester dans les grottes toute la nuit. En effet, les grottes sont pour la plupart sacrées et les ancêtres ne doivent pas être dérangés. Les guides nous interdisaient donc, le travail au delà de 22h.

#### **3.4.2.2. A Madagascar en général**

Un autre moyen d'obtenir des prélèvements aurait été de passer par les restaurateurs qui servent des « Fahany » ou Pteropus. Ces espèces étant protégées leur chasse est interdite et il était difficile de travailler hors la loi. Cela aurait pu porter préjudice aux restaurateurs et aux chasseurs comme ce fut le cas au Cambodge où l'on a imposé la fermeture des restaurants qui avaient collaboré avec l'institut Pasteur.

L'institut Pasteur va donc essayer d'obtenir une autorisation de chasse au Ministère des Eaux et Forêts. Ces autorisations ne sont pas facilement délivrées. Un restaurateur de Tuléar et un restaurateur de Tananarive se fournissant à Mahajanga ont été sollicités. Il reste à obtenir l'autorisation, à convenir d'un arrangement avec ces chasseurs en leur garantissant l'anonymat et d'organiser une ou deux autres missions. Mais même si l'on obtient une autorisation nous serons limités en nombre d'animaux pouvant être euthanasiés. Il faudrait donc mettre au point une technique de capture au filet afin de pouvoir relâcher les animaux après prélèvement. Si en Asie les captures au filet dans les arbres sont réalisées par des spécialistes, il est difficile de trouver à Madagascar des personnes capables d'effectuer ce travail périlleux. La chasse au fusil est en effet la seule technique en œuvre à Madagascar. L'idéal serait de pouvoir anesthésier les animaux au fusil ce qui permettrait de les relâcher après prélèvement.

---

### **3.4.3. Etat d'avancement du projet du RIPIA et réponses aux objectifs**

Tous les pays impliqués dans ce projet ne sont pas au même état d'avancement.

A Madagascar, les difficultés d'obtention de prélèvements n'ont pas permis de réaliser la détection sérologique. La banque de sérum est à compléter.

Au Cambodge par exemple où l'équipe a bénéficié de l'aide des restaurateurs, ils ont pu prélever un nombre suffisant de sérums et ont commencé les tests ELISA. Certains se sont révélés positifs. Ces résultats ont été confirmés par séroneutralisation selon la technique décrite en annexe 12. Il reste désormais à isoler ces virus et à effectuer la caractérisation moléculaire selon le protocole décrit en annexe 12.



Pour répondre à l'objectif principal du projet qui est de connaître la carte de répartition des Paramyxovirus, il faudra encore attendre.

Par contre concernant les objectifs secondaires qui étaient l'établissement d'une collaboration entre les instituts, il semble que de nombreux échanges ont lieu par courrier électronique. Il y aura peut être une rencontre à Kuala Lumpur à l'occasion d'une conférence internationale au sujet des Paramyxovirus.

De même la mise au point de techniques de détection sérologique a été effectuée à l'Institut Pasteur délocalisé à Lyon et il ne reste que le calibrage au sein des différents instituts. Ce calibrage est en cours à Madagascar et a été réalisé au Cambodge. Au Viet-Nam par contre l'avancement du projet est moindre. Les collections n'ont pas encore débuté.

## CONCLUSION:

Après l'étude que nous venons d'effectuer l'importance médicale, zoonotique et économique de ces maladies causées par les Paramyxovirus n'est plus à démontrer. Comme toutes les maladies infectieuses ayant la possibilité de sauter la barrière d'espèce et d'être transmises à l'homme, les Paramyxovirus de Chauve-souris doivent faire l'objet d'une attention particulière. Le RIPIA participe désormais activement au réseau d'épidémiologie internationale des maladies émergentes qui se met progressivement en place.

Ce stage m'a permis d'évoluer au sein d'une équipe pluridisciplinaire comprenant chercheurs, médecins, biologistes, zoologistes, éthologues, techniciens de laboratoire et de participer à un travail d'équipe où les compétences de chacun sont indispensables pour faire avancer la recherche. J'ai ainsi pu enrichir mes connaissances non seulement en virologie, en éthologie, en biologie des écosystèmes, en botanique mais aussi en ethnologie des populations malgaches.

Lors de la mission, j'ai beaucoup appris sur les relations humaines, j'ai pu prendre conscience de toutes les difficultés du terrain, des petits inconvénients qui peuvent être évités par l'expérience.

Cela m'a permis de me faire une idée sur la Recherche, le rôle du vétérinaire dans l'étude des maladies zoonotiques émergentes, le travail au sein d'une structure et d'un réseau de recherche.

La durée limitée du stage ne m'a malheureusement pas permis d'obtenir des résultats, le projet venant de débuter mais c'est avec beaucoup d'intérêt que je suivrai l'avancement des travaux.

Peut-être découvrirons nous l'existence de nouveaux virus à Madagascar ?

Je terminerai sur une citation de Louis Pasteur : « Il y a la science et les applications de la science liées entre elles comme le fruit et l'arbre qui l'a porté ».



## **ANNEXES**

fiche capture megachiroptères  
enquete paramyxovirus

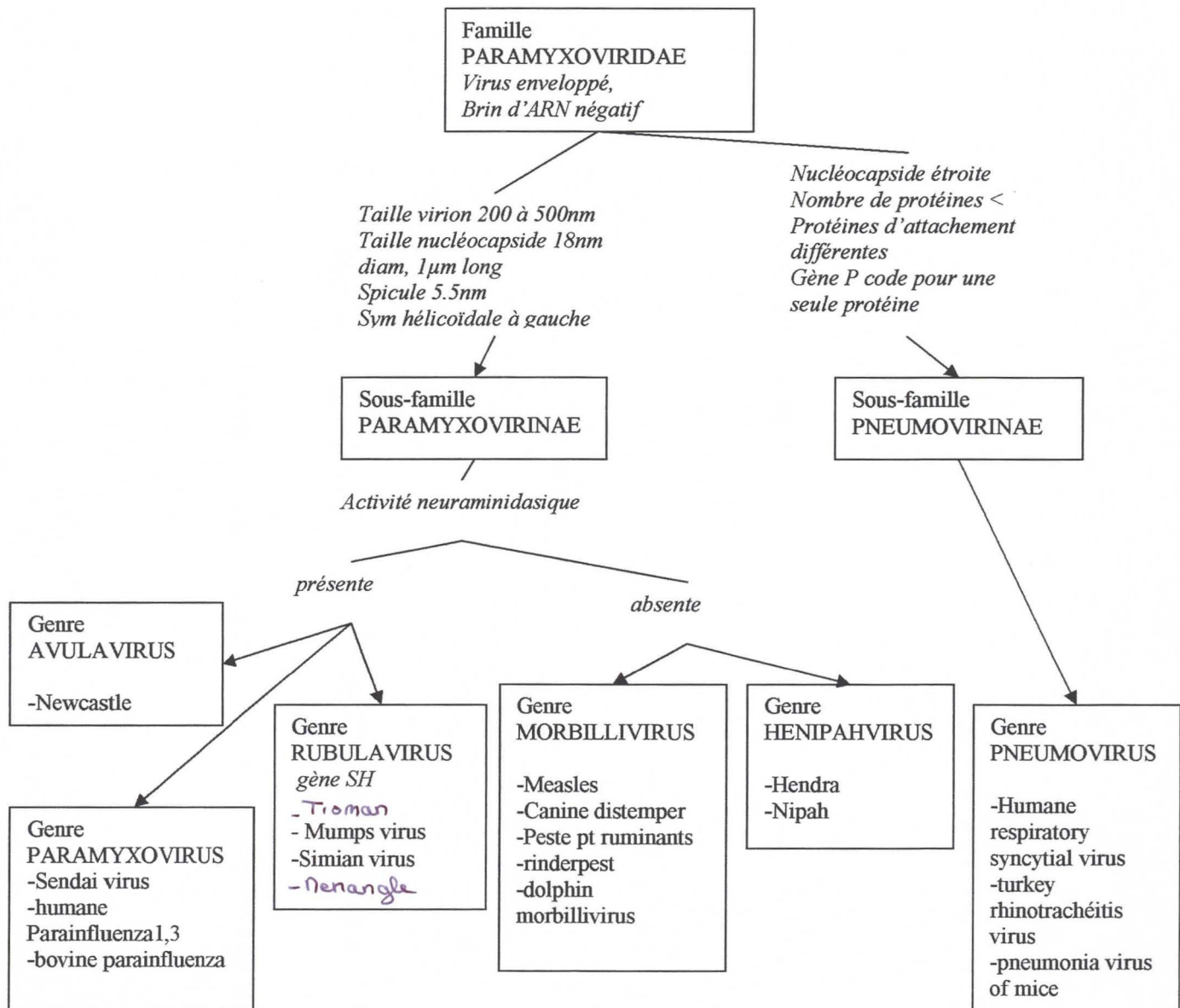
	lieu	num idt	espèce	sexe	age	LT	LQ	pied	oreille	avt bras	poids	vol sang	serum	alcool	frottis	gorge	GS	foie	rate	poum	rein
12/05/2003	B	13660	Roussetus	F	Ad	115	14	15	18	65	37.5	0.5	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	B	13661	Roussetus	F	Ad	111	13	15	17	59	31.5	0.4	hemolyse	X	X	X	X	X	X	X	X
	B	13662	Roussetus	F	Ad	118	15	16	18	65	36.5	1.1	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	B	13663	Roussetus	M	Ad	126	18	15	18	73	57.5	0.5	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	B	13664	Roussetus	F	Ad	115	16	14	19	66	38.1	0.8	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	B	13665	Roussetus	M	Ad	115	15	15	18	65	33.8	0.7	X	X	X	X	X	X	X	X	X
14/05/2003	D	SC529	Eidolon	M	Ad					125		1.0	X	X		X					
	D	SC530	Eidolon	M	Ad					127		0.8	X	X		X					
	D	SC531	Eidolon	M	Ad					130		0.7	X	X		X					
	D	SC532	Eidolon	M	Ad					130		1.5	X	X		X					
	D	SC533	Eidolon	M	Ad					132		1.3	hemolyse	X		X					
	D	SC534	Eidolon	M	J					129		0.3	X	X		X					
	D	SC535	Eidolon	F	Ad					132		0.5	X	X		X					
	D	SC536	Eidolon	F	J					130		0.7	X	X		X					
	D	SC537	Eidolon	M	Ad					120		2.1	X	X		X					
	D	SC538	Eidolon	M	Ad					120		0.6	X	X		X					
	D	SC539	Eidolon	F	J					125		1.3	X	X		X					
	D	SC540	Eidolon	M	Ad					127		1.4	X	X		X					



**Annexe 2 : principales lésions observées chez l'homme et chez l'animal lors des infections à HeV, NiV et MenV**

espèce/virus	HENDRA	NIPAH	MENANGLE
homme	<p><u>Lésions macroscopiques</u> -atteinte systémique des endothéliums, avec vascularite, thrombose, ischémie et nécrose 32 -congestion, hémorragie et œdème pulmonaire associées à des lésions d'alvéolite chronique.</p> <p><u>Lésions microscopiques</u> -destruction de la paroi des vaisseaux, caryorrhexie, infiltration de leucocytes et de mononucléaires ainsi que des cellules géantes -inclusions virales au niveau du noyau des cellules parenchymateuses du SNC.</p>	<p><u>Lésions macroscopiques</u> lésions vasculaires qui se situent préférentiellement au niveau des capillaires, artérioles, veinules du cerveau mais aussi des poumons, cœur et reins.</p> <p><u>Lésions microscopiques</u> nécrose et fibrose de la paroi vasculaire, thromboses, hémorragies avec une infiltration de neutrophiles et de mononucléaires</p>	Aucune autopsie réalisée chez l'homme
animal	<p><u>Lésions macroscopiques</u> -lésions de pneumonie interstitielle accompagnées d'un épanchement pleural et péricardique, de pétéchies au niveau de la plèvre, d'une congestion et d'une induration des poumons et des nœuds lymphatiques et de la dilatation des vaisseaux lymphatiques. poumon dit en damier rempli d'un mucus fibrineux à sanguinolent</p> <p><u>Lésions microscopiques</u> destruction massive des endothéliums et exsudats fibrineux. manchon périvasculaire de lymphocytes, nécrose des neurones et foyers de gliose</p>	<p><u>Lésions macroscopiques</u> trachéite, pneumonie interstitielle et bronchique</p> <p><u>Lésions microscopiques</u> <u>Si forme respiratoire</u> : hyperplasie et nécrose des épithéliums, exsudation, infiltration lymphocytaire et macrophagiques péri-bronchique et péri-bronchiolique</p> <p><u>si forme méningitique</u> : œdème fibrineux avec infiltration de lymphocytes, de neutrophiles de cellules plasmatiques et de macrophages au niveau de la substance blanche</p>	<p><u>Lésions macroscopiques</u> Lésion de méningite avec atteinte de la membrane arachnoïde</p> <p><u>Lésions microscopiques</u> dégénérescence extensive de la matière grise et de la matière blanche associée à des infiltrations de macrophages et de cellules inflammatoires</p>

### Annexe 3 : Classification des Paramyxovirus d'après l'ICTV





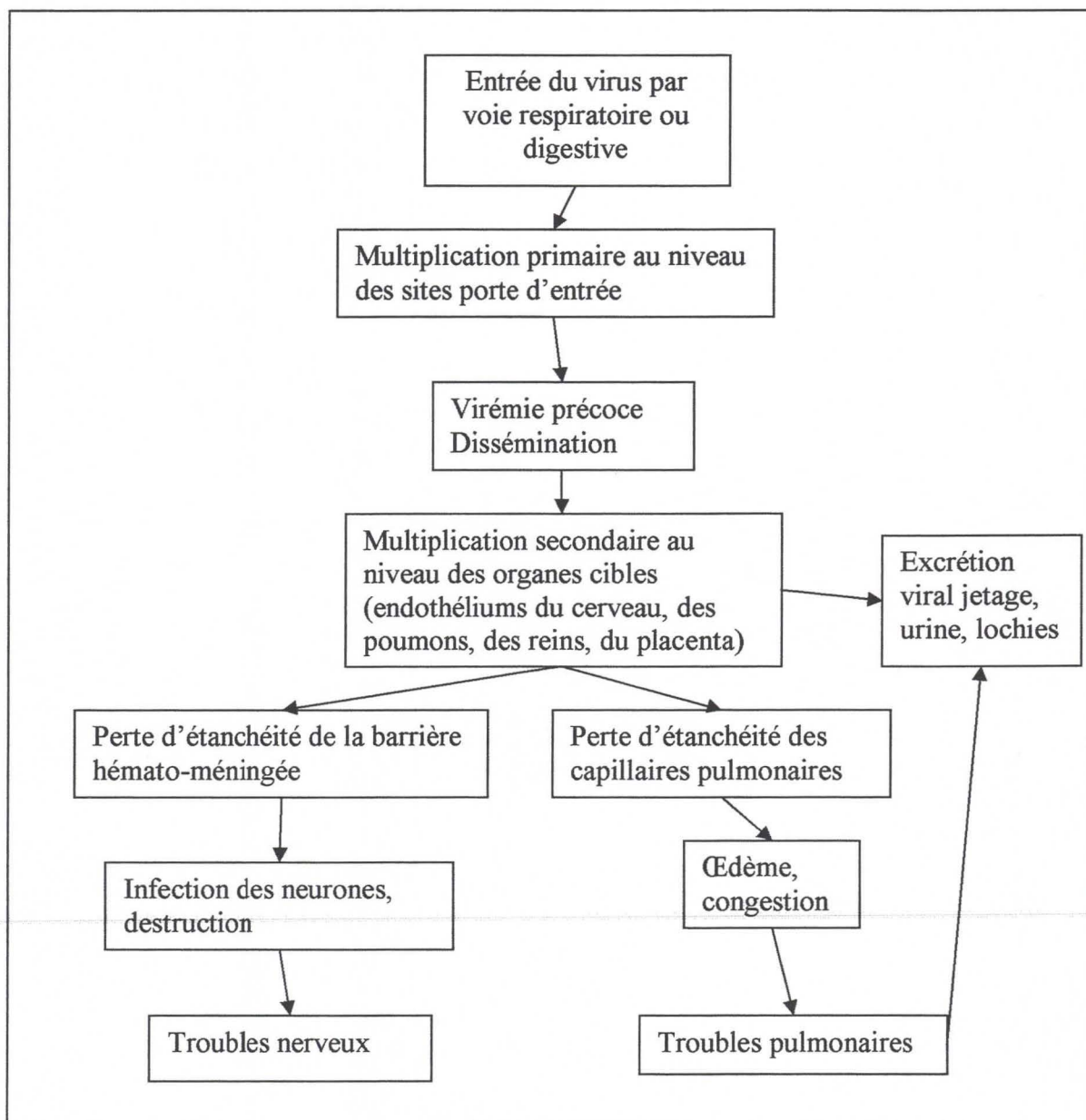
#### Annexe 4 : Schéma de la pathogénie

La voie d'entrée du virus NiV semble être le tractus digestif ou l'appareil respiratoire. Une première réplication virale semble avoir lieu au niveau de ces organes porte d'entrée ou à un autre niveau méconnu.

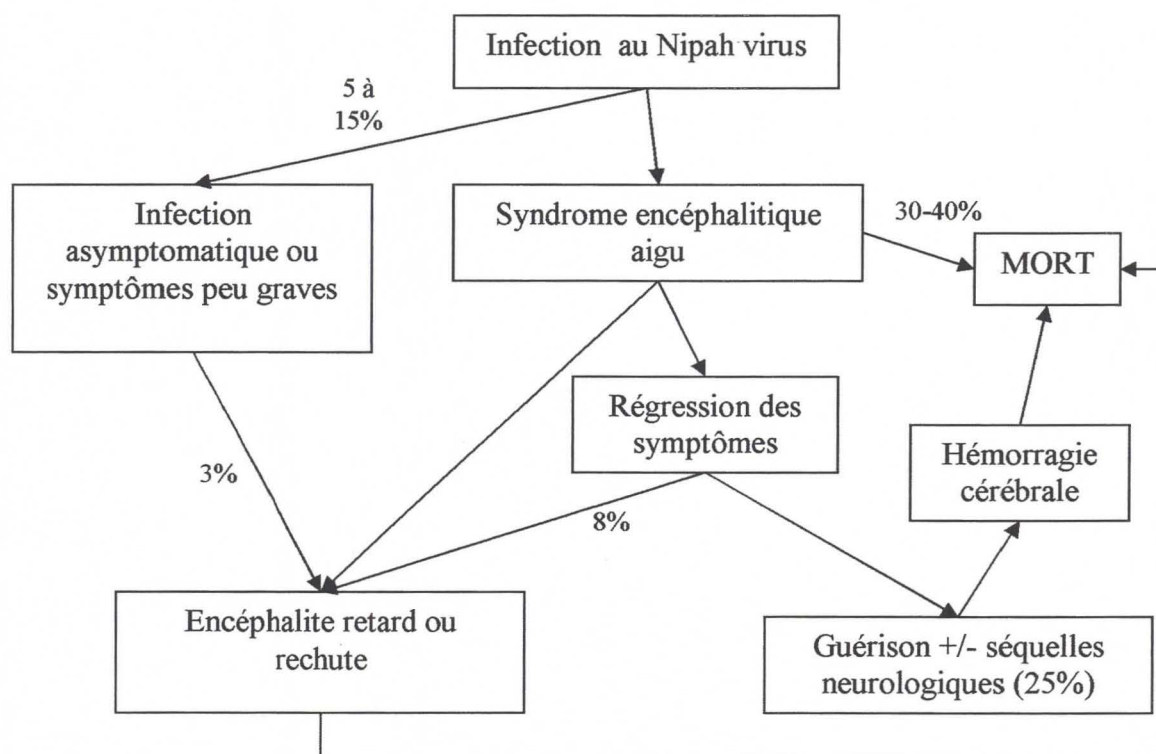
Puis rapidement le virus passe dans le sang et il y a dissémination virale dans tout le corps comme en témoignent la multitude des lésions de vascularite.

Les endothéliums semblent être le site de réplication secondaire. L'entrée du virus dans le cerveau s'explique par la perte d'étanchéité de la barrière hémato-méningée faisant suite à la vascularite.

Le virus serait ensuite excrété via le jetage, l'urine, les tissus fœtaux et pourrait infecter d'autres organismes.

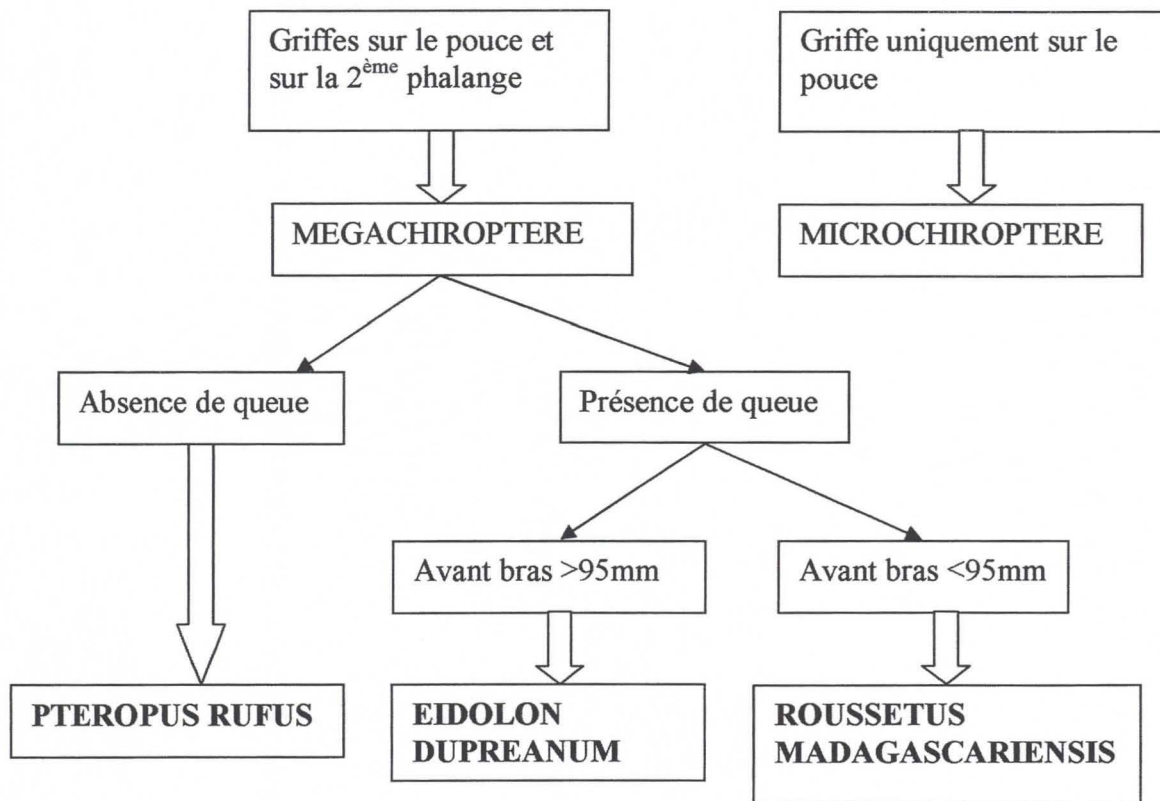


**Annexe 5 : Schéma du pronostic d'une infection à NiV chez l'homme**





## Annexe 6 : Diagnose des Megachiroptères



## Annexe 7 : Calendrier de mission

10/05/2003	Vol Tana-Diego, Récupération fret, organisation du transport avec le WWF, approvisionnement en eau et nourriture, nuit à Diego
11/05/2003	Transfert au campement des Princes (entrée ouest du parc de l'Ankarana) en 4X4, installation, nuit de capture grotte d' Ambahibe. Capture au filet de 9 m et à la harpe
12/05/2003 13/05/2003	Dissection des échantillons de la veille, nuit de capture grotte de chauves-souris. Capture avec 2 harpes
14/05/2003	Changement de campement passage du côté est du massif, nuit de capture au filet dans la forêt près du campement
15/05/2003 16/05/2003 17/05/2003	Capture grotte du 3ème canyon : 1 filet de 12 m et une harpe
18/05/2003	Capture avec 2 harpes grotte d'Andrafiabe
19/05/2003	Capture au filet dans le campement d'Andrafiabe
20/05/2003	Départ pour Diego en 4X4, Envoi des containers azote par fret



## Annexe 8 : Equipe de mission

Steeve Goodman, naturaliste détaché au WWF, étudie les caractéristiques morphométriques et la phylogénie des chiroptères de Madagascar, il décrit les nouvelles espèces qu'il a découvertes. Il réalise un échantillonnage de 5 individus par espèce et par grotte. C'est sur cet échantillonnage que je pouvais réaliser mes prélèvements d'organes.

Scott Cardiff : étudiant biologiste éthologue étudie l'impact des visites touristiques des grottes sur le comportement des chauves-souris. Avant notre arrivée il a étudié les colonies de chauves-souris, a procédé au dénombrement et aux comptes de sortie, a étudié les couloirs de vol des chiroptères afin d'optimiser nos chances de capture. Il bague un maximum de spécimen au cours des captures.

Jimmy Manesy et Philemon Tolanga, guides ANGAP, nous accompagnent et nous aident à la capture.

Roland : jeune du village de Mahamasina assure la cuisine et l'intendance.

Lisa Stano: une jeune volontaire américaine du « corps de la paix » qui venait en observateur



### Annexe 9 : liste du matériel de mission

MATERIEL	QUANTITE	MATERIEL	QUANTITE
trousse à dissection	1	marker fine	3
plateau de dissection	1	Parafilm	1
fiches de prélèvements	40	coton	2 sacs
bloc note	1	sac poubelle	15
alcool à 90	500ml	kraft	1
alcool à 70	2 L	portoir alcool	1
eau de javel	1L	portoir javel	1
javel cpé	10 cpés	lame de scalpel	20
pissette	2	caisse mission	1
boîte de lames	8 de 50	conteneur azote	2
gants en latex 6-7	1 boîte	élastique	1 boîte
gants en cuir	1	pipetman de 200µL	1
seringues 2ML	500	pipetman de 1000µL	1
aiguilles 0,5*16mm	200	cônes jaunes	1 sachet
lampe à alcool	1	cônes bleu	1 sachet
briquet	1	cotons de tige	150
piles lampes frontale 4,5V	8	règle	1
ampoule lampe frontale	3	balance électronique	1
lampe frontale	1	GPS	1
piles torche	5	jerrican essence	1
ampoule torche	2	huile de vidange	1
tubes Eppendorf	400	groupe électrogène	1
boîte de tube Eppendorf	3	centrifugeuse	1
tubes Nunc	600	harpe	2
tubes Nunc avec milieu culture	100	filet	2
étiquettes	50	masque	30
chiffon essuie tout	3	ficelle	1 rouleau
papier hygiénique	4	tente	1
caisse blanche	1	matelas gonflable	1

## Annexe 10 : localisation GPS des lieux de capture et des campements

Campement des princes

3 km au nord ouest de Mahamasina

coordonnés GPS : 12°57'34'' sud

49°07'9.7'' est

Grotte d'Ambahibe : 1<sup>er</sup> jour de capture

3 km au nord ouest de Mahamasina

coordonnés GPS : 12°58'0.5'' sud

49°07'9.6'' est

Grotte des chauves-souris : 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup> jour de capture

3 km au nord ouest de Mahamasina

coordonnés GPS : 12°57'37'' sud

49°07'0.85'' est

Campement Andrafiabe ou campement des américains : 4<sup>ème</sup>, 9<sup>ème</sup> jour de capture

coordonnés GPS : 12°55'52'' sud

49°03'22.4'' est

Grotte du 3<sup>ème</sup> canyon andodokotokana : 5<sup>ème</sup>, 6<sup>ème</sup>, 7<sup>ème</sup> jour de capture

3.5 km au sud est d'andrafiabe

coordonnés GPS : 12°56'30'' sud

49°03'20'' est

Grotte d'Andrafiabe : 8<sup>ème</sup> jour de capture

Campement Andrafiabe ou campement des américains

coordonnés GPS : 12°55'48.2'' sud

49°03'33.7'' est



## Annexe 11 : contention des Megachiroptères

Pour éviter les risques de morsure, il faut se munir de gants en cuir, sortir l'animal du filet. Pour cela on attrape d'abord la tête par le cou en mettant le pouce sous la mandibule inférieure en suite avec la main libre on défait les ailes et on libère les pattes. Ensuite on enfouit l'animal dans un pochon présenté par un seconde personne et ce n'est qu'au dernier moment qu'on relâche la tête et qu'on retire rapidement la main pendant que la seconde personne ferme le pochon. Pour sortir l'animal du pochon, on s'arrange pour faire sortir la tête que l'on attrape en premier.



illustrations de la contention



### **Séroneutralisation**

Le test classique de neutralisation sera réalisé par inhibition de la TCID<sub>50</sub>. Les différentes dilutions de sérums, de raison 2, chauffés à 56°C sont déposées en duplicate sur des plaques à 96 cupules puis un volume égal de virus contenant 100 doses cytotoxiques est ajouté dans le laboratoire de haute sécurité (laboratoire NSB 3 pour les morbillivirus et rubulavirus). Après une heure d'incubation à 37°C, 5x10<sup>4</sup> cellules Vero sont ajoutées dans chaque cupule et les plaques sont incubées pendant 4 jours à 37°C. Les surnageants sont retirés, les cellules sont fixées 10 minutes dans du formaldéhyde à 4% puis colorées avec du cristal violet pendant 30 minutes. Le titre des sérums correspond à l'inverse de la dilution inhibant l'effet cytopathogène du virus.

### **Isolement viral (IPC, IPHCMV, IPM)**

Les prélèvements de choix seront les urines et des écouvillons de gorge des animaux appartenant à une espèce trouvée séropositive (Daniels et al., 2001).

Les tentatives d'isolement viral et d'identification seront pratiquées sur cellules Vero E6 selon la technique décrite par Chua et al. (2002).

En présence d'un effet cytopathogène (ECP), l'identification se fera grâce à des ascites de souris hyperimmunisées contre les différents virus et en cas de positivité par des anticorps monoclonaux de spécificité anti-hénipavirus (Nipah/Hendra) et anti-Nipah. Des anticorps dirigés contre d'autres paramyxovirus (virus de la rougeole, virus de la maladie de Carré, etc.) pourront être obtenus auprès de Fabian Wild (U404) et de Marie-Françoise Belin (Hôpital Laennec Lyon, U413).

HeV et NiV sont classés dans le groupe à risque 4. La propagation du virus se fait donc en laboratoire de condition de NSB 4. Un compromis est nécessaire quand l'isolement du virus est nécessaire dans le but d'un diagnostic. Les laboratoires de virologie du RIPIA se trouvant en zone d'endémie sont susceptibles régulièrement d'isoler accidentellement ces virus dans le cadre de recherche de cause virale pour un syndrome de méningo-encéphalite. Ce risque ne doit pas supprimer toute tentative d'isolement, ce qui empêcherait alors de trouver parfois une étiologie à ces syndromes. Dans le cadre de ce projet, les isollements resteront au stade primaire et se feront dans un laboratoire de NSB 2. Il n'y aura pas d'amplification virale en cas d'isolement positif. Les lames pour IF seront séchées sous hotte et sous UV. L'identification pourra également se faire par technique moléculaire (cf Infra)

### **Caractérisation moléculaire des virus en cas d'isolement positif (IPC, IPHCMV, IPM, IPP)**

En présence d'un ECP (le type syncytial est attendu pour ces Paramyxovirus) et sans préjuger des résultats de l'IF, l'identification sera également faite par RT-PCR utilisant soit des amorces dégénérées permettant d'amplifier soit des virus de la famille des Paramyxoviridae, soit des virus des genres *Rubulavirus*, *Morbillivirus* ou *Henipavirus*, soit des amorces spécifiques pour les Paramyxovirus de chauve-souris déjà identifiés. Ces dernières amorces pourront être également choisies après alignement des séquences connues pour les virus Nipah, Hendra, Tioman et Menangle.

Pour chacun des 4 virus connus, 2 régions distantes sur le gène N seront concernées. Pour les genres viraux ou famille virale, en première intention, seule une région du gène N sera concernée. Les produits de PCR nichée auront une taille d'au moins 450 nucléotides.

En présence d'un ECP et en cas de résultat de PCR positif, les produits amplifiés seront séquencés. Les séquences seront analysées (alignement avec séquences de paramyxovirus disponibles dans GenBank) puis une analyse phylogénique permettra de placer la souche étudiée au sein d'une espèce virale ou au sein des autres paramyxovirus.

En présence d'un ECP et cas de résultat de PCR négatif, la démarche moléculaire utilisée par Chua et al. (2001) devrait être utilisée (cDNA subtraction strategy en particulier).



## BIBLIOGRAPHIE

1. Mackenzie, J.S., *Emerging viral diseases of Southeast Asia and the Western Pacific*. emerging infectious diseases, 2001. 7(3): p. 497-504.
2. Verin, P., *Madagascar*. 2000.
3. Planet, L., *Madagascar*. 2002.
4. IPM, *Atlas du paludisme à Madagascar*. 2002.
5. santé, M.d.l., *Annuaire des statistiques du secteur de santé de Madagascar*, in *Annuaire des statistiques du secteur de santé de Madagascar*, M.d.l. santé, Editor. 2000: Antananarivo.
6. IPM, *Rapport annuel de l'IPM*, ed. IPM. 2002, Antananarivo.
7. O'Sullivan, J.D., et al., *Fatal encephalitis due to novel paramyxovirus transmitted from horses*. The Lancet, 1997. 349(9045): p. 93-95.
8. Field, H., et al., *The natural history of Hendra and Nipah viruses*. Microbes and Infection, 2001. 3(4): p. 307-314.
9. Barclay, A.J. and D.J. Paton, *Hendra (Equine Morbillivirus)*. The Veterinary Journal, 2000. 160(3): p. 169-176.
10. Hooper, P.T.G.R.K., *The retrospective diagnosis of a second outbreak of equine morbillivirus infection*. Australian veterinary journal, 1996. 74: p. 244-245.
11. Westbury, H.A., *Infection due au virus Hendra chez les équidés*. Revue scientifique et technique de l'OIE, 2000. 19(1): p. 151-159.
12. Chant, *Probable human infection with a newly described virus in the family Paramyxoviridae*. emerging infectious diseases, 1998. 4(2): p. 273-275.
13. Philbey, *An apparently new virus (family Paramyxoviridae) infectious for pigs, humans, and fruit bats*. emerging infectious diseases, 1998. 4(2): p. 269-270.
14. Chua, K.B., et al., *Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig-farmers in Malaysia*. The Lancet, 1999. 354(9186): p. 1257-1259.
15. Chua, K.B., *Nipah virus outbreak in Malaysia*. Journal of Clinical Virology, 2003. 26(3): p. 265-275.
16. Farrar, J.J., *Nipah-virus encephalitis--investigation of a new infection*. The Lancet, 1999. 354(9186): p. 1222-1223.
17. Chua, K.B., et al., *Tioman Virus, a Novel Paramyxovirus Isolated from Fruit Bats in Malaysia*. Virology, 2001. 283(2): p. 215-229.
18. Murray, et al., *A novel Morbillivirus Pneumonia of horses and its transmission to humans*. emerging infectious diseases, 1995. 1(1): p. 31-34.
19. Westbury, H., *Hendra Virus: A Highly Lethal Zoonotic Agent*. The Veterinary Journal, 2000. 160(3): p. 165-166.
20. Wong, K.T., et al., *Late presentation of Nipah virus encephalitis and kinetics of the humoral immune response*. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 2001. 71(4): p. 552-554.
21. Chong, *Relapsed and late-onset Nipah encephalitis*. Annals of neurology, 2002. 51(6): p. 703-708.
22. Goh, K.J., *Clinical features of Nipah virus encephalitis among pigs farmers in Malaysia*. The new England Journal of Medicine, 2000. 342(17): p. 1229-1235.
23. Paton, D.J.D., *Viral infections of pigs: trends and new knowledge*. J. Comp. Path., 2002. 127: p. 77-95.

24. Bowden, T.R., et al., *Molecular Characterization of Menangle Virus, a Novel Paramyxovirus which Infects Pigs, Fruit Bats, and Humans*. Virology, 2001. **283**(2): p. 358-373.
25. Hooper, P., et al., *Comparative pathology of the diseases caused by Hendra and Nipah viruses*. Microbes and Infection, 2001. **3**(4): p. 315-322.
26. Lim, et al., *Nipah viral encephalitis or Japanese Encephalitis? MR findings in a new zoonotic disease*. American Journal of Neuroradiology, 2000. **21**: p. 455-461.
27. Goldsmith, C.S., et al., *Elucidation of Nipah virus morphogenesis and replication using ultrastructural and molecular approaches*. Virus Research, 2003. **92**(1): p. 89-98.
28. Wong, K.T., *Nipah virus infection, an emerging paramyxoviral zoonosis*. Springer seminars in immunopathology, 2002. **24**: p. 215-218.
29. Wang, L.-F., et al., *Molecular biology of Hendra and Nipah viruses*. Microbes and Infection, 2001. **3**(4): p. 279-287.
30. Harcourt, B.H., et al., *Molecular Characterization of Nipah Virus, a Newly Emergent Paramyxovirus*. Virology, 2000. **271**(2): p. 334-349.
31. Chua, et al., *Full length genome sequence of Tioman virus, a novel paramyxovirus in the genus Rubulavirus isolated from fruit bats in Malaysia*. Archives of virology, 2002. **147**: p. 1323-1348.
32. Daniels, P., T. Ksiazek, and B.T. Eaton, *Laboratory diagnosis of Nipah and Hendra virus infections*. Microbes and Infection, 2001. **3**(4): p. 289-295.
33. Ali, et al., *Nipah virus infection among military personnel involved in pig culling during an outbreak of encephalitis in Malaysia, 1998, 1999*. emerging infectious diseases, 2001. **7**(4).
34. Chew, et al., *Risk factors for Nipah virus infection among abattoir workers in Singapore*. emerging infectious diseases, 2000. **181**: p. 1760-1763.
35. Chua, K.B., et al., *Isolation of Nipah virus from Malaysian Island flying-foxes*. Microbes and Infection, 2002. **4**(2): p. 145-151.
36. Chow, V.T.K., et al., *Diagnosis of Nipah virus encephalitis by electron microscopy of cerebrospinal fluid*. Journal of Clinical Virology, 2000. **19**(3): p. 143-147.
37. Smith, I.L., et al., *Development of a fluorogenic RT-PCR assay (TaqMan) for the detection of Hendra virus*. Journal of Virological Methods, 2001. **98**(1): p. 33-40.
38. Crameri, G., et al., *A rapid immune plaque assay for the detection of Hendra and Nipah viruses and anti-virus antibodies*. Journal of Virological Methods, 2002. **99**(1-2): p. 41-51.
39. Chong, H.T., *Treatment of acute Nipah encephalitis with ribavirin*. Annals of neurology, 2001. **49**(6): p. 810-813.
40. Young, P.L., et al., *Serologic evidence for the presence in pteropus bats of a paramyxovirus related to equine morbillivirus*. emerging infectious diseases, 1996. **2**(3): p. 239-240.
41. Halpin, K., et al., *Newly discovered viruses of flying foxes*. Veterinary Microbiology, 1999. **68**(1-2): p. 83-87.
42. Mohd, G., Ong, *Nipah virus infection of pigs in peninsular Malaysia*. Revue scientifique et technique de l'OIE, 2000. **19**(1): p. 160-165.
43. Chua, K.B., et al., *The Presence of Nipah Virus in Respiratory Secretions and Urine of Patients during an Outbreak of Nipah Virus Encephalitis in Malaysia*. Journal of Infection, 2001. **42**(1): p. 40-43.



44. Williamson, M.M., et al., *Experimental Hendra Virus Infection in Pregnant Guinea-pigs and Fruit Bats (Pteropus poliocephalus)*. Journal of Comparative Pathology, 2000. **122**(2-3): p. 201-207.
45. Barker, S.C., *The Australian paralysis tick may be the missing link in the transmission of Hendra virus from bats to horses to humans*. Medical Hypotheses, 2003. **60**(4): p. 481-483.
46. Middleton, D.J., et al., *Experimental Nipah Virus Infection in Pigs and Cats*. Journal of Comparative Pathology, 2002. **126**(2-3): p. 124-136.
47. Mounts, et al., *A cohort study of health care workers to assess nosocomial transmissibility of Nipah virus, Malaysia*. emerging infectious diseases, 2001. **183**: p. 810-813.
48. Sahani, et al., *Nipah virus infection among abattoir workers in Malaysia, 1998-1999*. International Journal of Epidemiology, 2001. **30**(5): p. 1020-1021.
49. Lam, S.-K., *Nipah virus—a potential agent of bioterrorism?* Antiviral Research, 2003. **57**(1-2): p. 113-119.
50. Black., P.F., et al., *Serological examination for evidence of infection with Hendra and Nipah viruses in Queensland piggeries*. Australian veterinary journal, 2001. **79**(6): p. 424-426.
51. Kirkland, et al., *Epidemiology and control of Menangle virus in pigs*. Australian veterinary journal, 2001. **79**(3): p. 190-191.
52. Eger, M., *Biogeography of the bats of Madagascar*, in *Biogéographie de Madagascar*, Orstom, Editor. 1996: Paris. p. 321-328.
53. Eaton, B.T., *Introduction to Current focus on Hendra and Nipah viruses*. Microbes and Infection, 2001. **3**(4): p. 277-278.
54. Carroll, F., *Conservation of western indian ocean fruit bats*, in *Biogéographie de Madagascar*, Orstom, Editor. 1996: Paris. p. 329-335.
55. Juste, et al., *Phylogeography of African fruitbats (Magechiroptera)*. Molecular Phylogenetics and Evolution, 1999. **13**(3): p. 596-604.
56. Benstead and Goodman, *The natural history of Madagascar*, T.u.o.c. press, Editor. 2003: Chicago. p. 1853-1888.
57. Granek, E., *Conservation of Pteropus livingstonii based on roost site habitat characteristics on Anjouan and Mohéli, Comoros Islands*. Biological conservation, 2002. **108**(1): p. 93-100.
58. Chua, K.B., *A novel approach for collecting samples from fruit bats for isolation of infectious agents*. Microbes and Infection, 2003. **5**(6): p. 487-490.
59. Gerard, H., Lebeurier, *virologie moléculaire*.